

**Nachweis und Charakterisierung  
einer phasenspezifischen  
mitosebeschleunigenden Substanz  
bei *Physarum polycephalum***

Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
– Dr. rer. nat. –

dem Fachbereich Biologie/Chemie  
der Universität Bremen  
vorgelegt von

**HEINZ-UWE HOBOHM**

aus  
Helmstedt

Bremen 1989







Digitized by the Internet Archive  
in 2026

[https://archive.org/details/IA41543102\\_0002](https://archive.org/details/IA41543102_0002)

**Nachweis und Charakterisierung  
einer phasenspezifischen  
mitosebeschleunigenden Substanz  
bei *Physarum polycephalum***

**DISSERTATION**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften  
- Dr.rer.nat. -

dem Fachbereich Biologie / Chemie der Universität Bremen vorgelegt von

**HEINZ-UWE HOBOHM**

aus

**HELMSTEDT**



Prof. Dr. L. Rensing

Prof. Dr. A. Hildebrandt

Prof. Dr. A. Hildebrandt

Prof. Dr. A. Hildebrandt

Gutachter:

Prof. Dr. L. Rensing

Prof. Dr. A. Hildebrandt



## Ein Redemann

ist mehr als tausend

Redemänner.

Meister Eckhard



# INHALTSVERZEICHNIS

|         |                                                                                                              |
|---------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1.      | <u>EINLEITUNG</u>                                                                                            |
| 1.1     | Modelle des Zellzyklus                                                                                       |
| 1.2.    | Der Zellzyklus von <i>Escherichia coli</i>                                                                   |
| 1.3.    | Der Zellzyklus von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> und <i>Schizosaccharomyces pombe</i>                      |
| 1.3.1.  | Die Zellzyklusgene <i>cdc2</i> , <i>cdc25</i> , <i>wee</i> , <i>nim</i> von <i>Schizosaccharomyces pombe</i> |
| 1.3.2.  | Die Sequenzverwandtschaften von <i>cdc</i> -Genen                                                            |
| 1.3.3.  | Die Funktion der <i>cdc</i> -Genprodukte                                                                     |
| 1.4.    | Der Maturation-promoting-factor MPF                                                                          |
| 1.5.    | Cyclin                                                                                                       |
| 1.6.    | Weitere zellzyklusspezifische Proteine                                                                       |
| 1.6.1.  | PCNA                                                                                                         |
| 1.6.2.  | Dividin                                                                                                      |
| 1.6.3.  | Statin                                                                                                       |
| 1.6.4.  | Sonstige                                                                                                     |
| 1.7.    | Wachstumsfaktoren + Onkogene                                                                                 |
| 1.7.1.  | Der Mechanismus der Wirkung von Wachstumsfaktoren                                                            |
| 1.7.2.  | Die Beziehung von Wachstumsfaktoren mit Protoonkogenen und Transkriptionsfaktoren                            |
| 1.8.    | In gut untersuchten Systemen findet man oft eine multi-kausale Regulation                                    |
| 1.8.1.  | Beispiele                                                                                                    |
| 1.8.2.  | Die Beziehung von <i>cdc</i> -Genen und Wachstumsfaktoren mit Differenzierungsgenen                          |
| 1.9.    | <i>Physarum polycephalum</i> als Modellorganismus für die Analyse des Zellzyklus                             |
| 1.10.   | Ziel der Arbeit                                                                                              |
| 2.      | <u>MATERIAL UND METHODEN</u>                                                                                 |
| 2.1.    | Kultivierung in Schüttelkultur                                                                               |
| 2.2.    | Spherulenbildung und Rekultivierung                                                                          |
| 2.3.    | Makroplasmodien                                                                                              |
| 2.4.    | Bestimmung des Mitosezeitpunktes                                                                             |
| 2.5.    | Extraktpräparation                                                                                           |
| 2.6.    | Injektion                                                                                                    |
| 2.7.    | Optimierung des Injektionspuffers                                                                            |
| 2.8.    | Die Injektion verschiedener Substanzen                                                                       |
| 2.9.    | Flow-Zytometrie                                                                                              |
| 2.10.   | Bestimmung der antibiotischen Wirkung des Extrakts                                                           |
| 2.11.   | Extraktdegradation                                                                                           |
| 2.12.   | Vorfiltration mit NAP10 und CENTRISART                                                                       |
| 2.13.   | Hitzeschock                                                                                                  |
| 2.13.1. | Hitzeschock vor Extraktgewinnung                                                                             |
| 2.13.2. | Hitzeschock nach Injektion                                                                                   |
| 2.14.   | Gelelektrophorese                                                                                            |
| 2.14.1. | Gelelektrophorese nach LAEMMLI / SCHLEICHER                                                                  |
| 2.14.2. | Gelelektrophorese nach SCHAEPPER & VON JAGOW                                                                 |
| 2.15.   | Ionenaustauschchromatographie                                                                                |
| 2.16.   | Gelfiltration                                                                                                |
| 2.16.1. | Gelfiltration mit NAP-Minisäulen                                                                             |
| 2.16.2. | Gelfiltration mit TSK-HW40S (MERCK)                                                                          |
| 2.17.   | HPLC (Hochdruckflüssigkeitschromatographie)                                                                  |
| 2.18.   | FAB (Fast-atomic-bombardment Massenspektrometrie)                                                            |
| 3.      | <u>ERGEBNISSE</u>                                                                                            |
| 3.1.    | Optimierung des Injektionspuffers                                                                            |
| 3.2.    | Injektion von RNase                                                                                          |

- 3.3. Intraplasmodiale Synchronie
- 3.4. Interplasmodiale Synchronie
- 3.5. Wirkung des Injektionspuffers auf den Mitosezeitpunkt
- 3.6. Die Injektion von weiteren Substanzen
- 3.7. Wirkung der Injektion von Zellextrakten auf den Mitosezeitpunkt
- 3.8. Wirkung eines Hitzeschocks
- 3.8.1. Hitzeschock während der aktiven Phase
- 3.8.2. Hitzeschock 2 und 4 Stunden nach Injektion
- 3.9. Einleitende Versuche zur Charakterisierung einer zellzyklusbeschleunigenden Aktivität
- 3.9.1. Stabilität des aktiven Extrakts
- 3.9.2. Degradationsversuche
- 3.9.3. Vorfiltration mit NAP-10 Minisäulen und CENTRISART
- 3.10. Analytische SDS-Gelelektrophorese
- 3.11. Kernfluoreszenz einer asynchronen Variante
- 3.12. Eine antibiotische Aktivität des Extraktes
- 3.13. Ionenaustauschchromatographie
- 3.14. Gelfiltration
- 3.15. HPLC (Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie)
- 3.16. FAB (Fast-atomic-bombardment Massenspektrometrie)

#### 4. DISKUSSION

- 4.1. Bei der aktiven Substanz handelt es sich wahrscheinlich um ein Protein
- 4.2. Die Stabilität des Extraktes
- 4.3. Andere Ansätze der Suche nach einem Aktivator der Mitose bei *Physarum*
- 4.4. Ein Kontrollpunkt im Zellzyklus beim Übergang G2/M
- 4.4.1. Die Determination zur Mitose bei *Physarum*
- 4.4.2. Weitere Veränderungen am mitotischen Kontrollpunkt bei *Physarum*
- 4.4.3. Kontrollpunkte des Zellzyklus bei anderen Organismen
- 4.5. Die Aktivierung der mitosebeschleunigenden Substanz
- 4.6. Eine mögliche Wirkung der mitosebeschleunigenden Substanz auf die DNA-Replikation
- 4.7. Eine mögliche Wirkung der mitosebeschleunigenden Substanz auf die Mitose
- 4.7.1. Die Hypothese eines instabilen mitotischen Aktivators im Vergleich zur Wirkung von verschiedenen Störpulsen sowie Fusionsexperimenten
- 4.7.2. Proteolytisches Spaltprodukt
- 4.7.3. Autophosphorylierung
- 4.8. Ausblick

#### 5. ZUSAMMENFASSUNG

#### 6. LITERATUR

### Abkürzungen

|                |                                             |
|----------------|---------------------------------------------|
| Beschl.        | Beschleunigung                              |
| bp             | Basenpaare                                  |
| cdc            | cell division cycle                         |
| Da             | Dalton                                      |
| FAB            | Fast-atomic-bombardment Massenspektrometrie |
| G0-Phase       | Ruhephase                                   |
| G1-Phase       | Phase des Zellzyklus zwischen M und S       |
| G2-Phase       | Phase des Zellzyklus zwischen S und M       |
| h              | Stunden(n)                                  |
| H1, H2, H3, H4 | Histon                                      |
| HPLC           | Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie       |
| kDa            | Kilodalton                                  |
| M              | Mitose                                      |
| M1, M2, M3     | n.te Mitose nach Fusion von Mikroplasmodien |
| MG             | Molekulargewicht                            |
| MPF            | maturation promoting factor                 |
| NHP            | Nicht-Histonproteine                        |
| OD             | optische Dichte                             |
| PCNA           | proliferating cell nuclear antigen          |
| S-Phase        | DNA-Synthesephase                           |
| SDS            | Natrium-Dodecylsulfat                       |
| TFA            | Trifluoressigsäure                          |
| U              | Units                                       |
| Verz.          | Verzögerung                                 |



Der eukaryotische Zellzyklus, d.h. der Rhythmus aus Wachstum, Replikation und Teilung, ist auf molekularer Ebene noch weitgehend unverstanden. Allerdings mehren sich in jüngerer Zeit Befunde auf genetischer Ebene, die hauptsächlich an Hefen erhoben wurden, und auch auf proteinchemischer Ebene, die zu einem einheitlichen Konzept zusammenzuwachsen scheinen. Zum einen ergibt sich daraus in Ansätzen das Bild eines komplizierten regulatorischen Systems. Zum anderen zeigen sich deutliche Gemeinsamkeiten zwischen so divergenten Organismen wie Hefen, marinen Invertebraten und Zellkulturzellen aus Säugergeweben, die vermuten lassen, dass der Mechanismus des Zellzyklus bei Eukaryoten im Prinzip übereinstimmt. *Physarum*, das Untersuchungsobjekt dieser Arbeit, ist aufgrund der einzigartigen synchronen Kernteilung in den Plasmodien als Modellorganismus für Fragen des Zellzyklus seit langem etabliert. Trotzdem kam es bei *Physarum* bislang molekularbiologisch nicht zu einer ähnlichen Entwicklung wie bei anderen Organismen. Das liegt zum einen an der mangelnden Zugänglichkeit von *Physarum* für genetische Studien, zum anderen am Fehlen einer biologischen Testmethode für zellzyklisch relevante Substanzen.

In dieser Arbeit wurde der Versuch unternommen, eine solche Testmethode zu etablieren und sie zur Suche nach möglichen molekularen Regulationselementen einzusetzen.

## 1.1 Modelle des Zellzyklus

Zellen in Zellpopulationen, ob in Gewebekulturen oder vielzelligen Organismen, gehören zu einer von drei verschiedenen Subpopulationen: Zellen, die sich kontinuierlich teilen; ruhende Zellen, die aber infolge eines passenden Stimulus wieder in den Zellzyklus eintreten können, sowie ausdifferenzierte Zellen, die die Teilungsfähigkeit vollständig verloren haben.

Der Zellzyklus wachsender Zellen ist durch mehrere globale Prozesse charakterisiert. Die Replikation führt zu einer exakten Verdoppelung der DNA (S-Phase), während das Zellwachstum eine ungefähre Verdopplung der zellulären Bestandteile und des Zellvolumens zur Folge hat. Durch Mitose und Cytokinese entstehen zwei Zellen, die jede für sich den Zyklus neu beginnen. Das Intervall zwischen M und S wird als G1-Phase, zwischen S und M als G2-Phase bezeichnet. Die Länge des Zellzyklus hängt dabei sowohl von externen Parametern wie der Verfügbarkeit von Nährstoffen oder der Temperatur ab, als auch von internen Parametern wie dem Stadium der Differenzierung oder dem Alter der Zelle. Sie liegt bei Prokaryoten im Bereich von 10-60 Minuten, bei eukaryotischen Zellen in Zellkultur bei 3 bis 20 Stunden, bei differenzierten Gewebezellen im Wochen- und Monatsbereich [ALBERTS et al 1983].

Das Kontrollsystem der Zelle, das die Proliferationsrate bestimmt, ist eines der wichtigsten - noch ungelösten - Probleme Zellbiologie. Damit hängen die Fragen nach der Entstehung von Krebszellen (ungehemmte Teilung) und der Zellalterung (verzögerte bzw. ausbleibende Teilung) zusammen.

In ersten Modellansätzen wurde versucht, das Wachstumsverhalten prokaryotischer Zellen (hier werden im wesentlichen deterministische Modelle diskutiert) bzw. von eukaryotischen Zellkulturzellen (hauptsächlich probabilistische Modelle) mathematisch zu be

schreiben. Das wesentliche Postulat des deterministischen Modells ist, dass die Rate der Zellteilung abhängt von der Rate des Zellwachstums [KOCH & SCHAECHTER 1962]. Es erklärt sehr einfach, warum in exponentiell wachsenden Zellpopulationen die Zellgrösse zur Teilung, zum Beginn der S-Phase ( bei *E.coli*) [DONACCHIE 1968] oder bei 'Start' (einem Kontrollpunkt des Zyklus von *S.pombe*) [JOHNSTON et al 1977]) jeweils konstant bleibt. Auch Organismen wie das Plasmodium von *Physarum* oder die frühen Teilungen bei Froschoozyten werden durch dieses Modell gut beschrieben, wobei es sich hier allerdings um Sonderfälle handelt. Beim Plasmodium von *Physarum* hat man es mit einer vielkernigen Zelle zu tun, in der sich die Kerne teilen, Froschoozyten teilen sich bis zum Blastulastadium ohne Wachstum, werden also kleiner. Das probabilistische Modell von SMITH und MARTIN versucht der sehr variablen Zykluslänge in eukaryotischen Zellkulturen Rechnung zu tragen, denn die Variabilität der Zykluszeit kann durch das deterministische Modell ohne Zusatzannahmen nicht erklärt werden [SMITH & MARTIN 1973]. Es unterteilt den Zellzyklus in einen variablen A-Teil (G1-Phase) und einen B-Teil von konstanter Länge (S,G2,M-Phase). Zu jedem Zeitpunkt der A-Phase hat die Zelle demzufolge eine konstante Wahrscheinlichkeit pro Zeiteinheit, in die B-Phase überzutreten.

Weitere Beobachtungen konnten durch diese einfachen Modelle allerdings nicht befriedigend beschrieben werden:

- So wurde bei einigen Zellpopulationen auch eine deutliche Variabilität der G2-Phase gefunden [VAN WIJK et al 1977].
- LISKAY fand eine Hamsterzelllinie ohne messbare G1 bzw. G2-Phase, die eine kontinuierliche DNA-Synthese während der Interphase aufweist [LISKAY 1977].

- Die Variabilität der Zellzyklusszeiten von 3T3-Zellen ist bei Schwesterzellen geringer als bei nichtverwandten Zellen, was bei einem reinen stochastischen Prozess nicht der Fall wäre [DAWSON et al 1965, BROOKS 1985].
- Der Wechsel vom nährstoffentzugsbedingten Ruhestadium (Q bzw. G0-Phase) zum Wachstumsstadium verläuft sehr langsam und benötigt mindestens die Dauer eines vollen normalen Zyklus [BROOKS et al 1980]. Der stochastische Prozess könnte dann nur einen Teil der Erholungsphase ausmachen oder er würde anders parametrisiert sein als bei normalem Wachstum.
- Die G1-Phase von 3T3-Zellen kann unterteilt werden durch den R-Punkt (restriction-point) in eine serumabhängige Phase von 3-4 Stunden, während der Serumentzug oder Cycloheximid den Eintritt in das Ruhestadium (G0-Phase) bewirkt, und einen serumunabhängigen Teil bis zur S-Phase, während der Serumentzug die Zellen nicht aus dem normalen Zellzyklus entfernt. Dieser zweite Teil ist gleichzeitig für die Gesamtvariabilität von G1 verantwortlich [ZETTERBERG & LARSSON 1985].

In erweiterten Modellen wurden zusätzliche Unterteilungen des Zyklus in konstante und mehrstufige stochastische Anteile vorgenommen, um diesen Befunden Rechnung zu tragen [z.B. NURSE 1980, BROOKS 1985].

## 1.2. Der Zellzyklus von *Escherichia coli*

Im *E.coli*-Zellzyklus gibt es mehrere Kontrollpunkte:

- eine Zeit- oder Grössenkontrolle: DNA-Synthese und Teilung werden bei einer genau definierten Zellgrösse

eingeleitet.

- eine Positionskontrolle: die Septumformation findet genau in der Zellmitte statt.
- eine Kontrolle über die Verfügbarkeit von Nährstoffen: in stationärer Phase akkumuliert *E.coli* als kleine, d.h. neugeborene Zelle.

Der Eintritt in die S-Phase scheint nicht von der Teilung abzuhängen, dagegen scheint die Teilung von einer erfolgreichen Termination der Replikation abhängig zu sein [HOLLAND 1987]. Etwa 20 Minuten vor der Septumformation erfolgt die "Festlegung" der Teilung, danach ist beispielsweise keine Proteinsynthese mehr notwendig. Die Suche nach Teilungsmutanten beschränkte sich hauptsächlich auf die Isolierung von Stämmen, die teilungsunfähig sind und als lange Filamente wachsen. Der sogenannte *ftsA*-Cluster enthält mindestens 5 eng benachbarte Gene (*ftsQ*, *ftsA*, *ftsZ*, *envA*, *ftsI*), die für die Teilung, nicht aber das Wachstum notwendig sind. Ein zweiter Cluster enthält die Gene *ftsE*, *ftsS*, *ftsX*, *ftsY*.

Beide Regionen sind cloniert und die meisten Genprodukte identifiziert worden. Die Synthese von *FtsA* wird während einer kurzen Periode (25-30min) vor der Septumformation benötigt, eine Akkumulation dieses Proteins über den gesamten Zellzyklus ist nicht notwendig [DONACCHIE 1981]. Die Genprodukte *FtsQ*, *FtsA*, *FtsI* sind wahrscheinlich an der Bildung der Peptidoglycanschicht auf den neugebildeten Kappen der Tochterzellen beteiligt [NANNINGA et al 1985]. *FtsZ* scheint an der Initiation des Septums beteiligt zu sein [HOLLAND & JONES 1985] und ist ein positiver Regulator der Zellteilung: geringfügige Überproduktion führt zu einer verstärkten Teilungsaktivität und zu Minizellen ohne DNA [WARD & LUTGENHAUS 1985]. Eine konservierte Region in *ftsE* zeigt Se-

quenzähnlichkeit zu bakteriellen ATP-bindenden Proteinen, die in den Membrantransport involviert sind. Damit könnte FtsE eine Rolle beim zellzyklusabhängigen Ionentransport haben. EnvA wirkt im letzten Stadium der Trennung. ftsY benachbart findet sich eine Sequenz mit Kinaseähnlichkeit; damit scheinen auch bei *E.coli* posttranslationale Modifikationen eine Rolle bei der Regulation des Zellzyklus zu spielen [HOLLAND 1987].

Einige dieser Genprodukte sind mit "Stressregulons", mit metabolischen Regelkreisen, die mit der Reaktion auf DNA-Schädigung oder Hitzeschock zu tun haben, verknüpft. FtsZ wird reguliert durch einen Inhibitor SfiA, der in Antwort auf DNA-Schäden einen sofortigen Stop der DNA-Synthese und damit des Teilungsrhythmus bewirkt. Die Inaktivierung von dnaK, einem der Haupt-hitzeschockgene, blockiert ebenfalls die Zellteilung. DnaK ist eine Proteinkinase mit einer starken Sequenzähnlichkeit mit dem Hitzeschockprotein HSP70 von *Drosophila* [Referenzen in HOLLAND 1987]. Die Analyse zweidimensionaler Elektrophoresegele bei synchronen Kulturen zeigte für 750 Polypeptide keine systematischen Änderungen [LUTGENHAUS et al 1979].

### 1.3. Der Zellzyklus bei *Saccharomyces cerevisiae* und *Schizosaccharomyces pombe*

Hefen haben sich als sehr gute Modellorganismen für die genetische Analyse der Mechanismen eukaryotischer Zellzykluskontrolle erwiesen. So wurde eine Reihe von temperatursensitiven Mutanten gefunden, die nur bei einem begrenzten Temperaturintervall den normalen Zellzyklus durchlaufen können, bei einer anderen, nichtpermissiven Temperatur jedoch den Zyklus stoppen und bestimmte Funktionen (z.B. DNA-Synthese) einstellen oder sterben.

Bis heute wurden in *S.pombe* etwa 40 Zellzyklusmutanten (*cdc*-Gene) sowie zwei Zykluskontrollpunkte gefunden. Bei 'Start', einem Kontrollpunkt des Zyklus innerhalb der G1-Phase, sind eine bestimmte Grösse sowie die Genprodukte von *cdc2* und *cdc10* notwendig, um das Durchlaufen des restlichen Zyklus zu ermöglichen. Bis 'Start' kann die Zelle bei Nährstoffmangel den alternativen Entwicklungsweg der Konjugation und Sporulation einschlagen, nach 'Start' wird der mitotische Weg durchlaufen [NASMYTH 1979]. Ein zweiter Kontrollpunkt während G2 bestimmt den Zeitpunkt der nachfolgenden Mitose. Auch hier sind Zellgrösse und Nährstoffverfügbarkeit limitierende Faktoren.

Warum lediglich *S.pombe* einen zweiten Kontrollpunkt beim G2/M-Übergang besitzt, an dem auf Nährstoffversorgung geprüft wird, nicht jedoch menschliche Zellkulturzellen und *S.cerevisiae*, darüber wurde folgendes spekuliert [MURRAY 1987b]: in *S.pombe* erfolgt das Zellwachstum lokal, so dass die Zellen asymmetrisch wachsen. Zum Zeitpunkt der Teilung muss eine grössere Fläche Zellwand neu synthetisiert werden, was nur bei abgeschlossener DNA-Synthese und stärkerer Biosynthese am Ende des Zyklus geleistet werden kann.

#### 1.3.1. Die Zellzyklusgene *cdc2*, *cdc25*, *wee*, *nim* von *Schicosaccharomyces pombe*

Das *wee1*<sup>+</sup>-Genprodukt wirkt am zweiten Kontrollpunkt in der G2-Phase als dosisabhängiger Mitoseinhibitor, während *cdc2*<sup>+</sup> als Induktor wirkt. *wee1*<sup>+</sup>-Mutanten erreichen die Mitose schneller und bei etwa der halben Grösse des Wildtyps [NURSE & THURIAUX 1980]. Temperatursensitive Mutanten eines weiteren Gens *cdc25*<sup>+</sup> arretieren ebenfalls am mitotischen Kontrollpunkt, ein Defekt, der von *wee1*<sup>-</sup> und *cdc2*<sup>w</sup> unterdrückt werden kann. *cdc25* wirkt als dosisabhängiger Induktor der Mitose und somit als Gegenpart zu *wee1*.

cdc25 und weel scheinen eher als unabhängige denn als einander hemmende Mitoseregulatoren zu wirken: die Inaktivierung von cdc25+ ist dann nicht letal, wenn weel+ ebenfalls inaktiviert wird, und Überexpression von cdc25 ist nicht letal, solange weel aktiv ist. Demnach könnte das Verhältnis der cdc25- und weel-Aktivität die Initiation der Mitose bestimmen [SIMANIS et al 1986]. Ein weiterer mitotischer Aktivator, das nim1-Genprodukt, scheint ein dosisabhängiger Inhibitor von weel zu sein; Überexpression von nim1 kann cdc25-Mutationen ausgleichen. Die vier Genprodukte nim1+, weel+, cdc2+ und cdc25+ scheinen positiv und negativ wirkende Kontrollelemente zu sein und kooperativ den Mitosezeitpunkt zu regulieren [RUSSEL & NURSE 1987].

#### 1.3.2. Sequenzverwandtschaften von cdc-Genen

Weitere Hinweise auf die Struktur des Kontrollsystems erbrachte die Klonierung und Sequenzierung verschiedener cdc-Gene. cdc2 ist zu 62% sequenzähnlich mit cdc28 von *S.cerevisiae*. CDC28 weist eine Kinaseaktivität auf und kontrolliert ebenfalls den Übergang von 'Start' [HINDLEY 1984]. cdc28 ist zu 20% sequenzähnlich mit der katalytischen Untereinheit der cAMP-abhängigen Proteinkinase sowie weiteren Proteinkinasekandidaten der src-Onkogenfamilie; ausserdem ist eine 60 Aminosäuren lange Domäne von cdc2 und cdc28 einer gleichlangen Domäne im FtsA-Protein von *E.Coli* sehr ähnlich [ROBINSON & DONACCHIE 1987]. Zwischen cdc28 und verschiedenen Onkogenen von Vertebraten wurden ebenfalls deutliche Übereinstimmungen festgestellt [LORINCZ & READ 1984].

#### 1.3.3. Funktion der cdc-Genprodukte

cdc2, cdc10 und cdc25 könnten aufgrund ihrer Länge Proteine von 34 kD, 85 kD und 70 kD codieren [HINDLEY & PHEAR 1984, AVES et al

1985, RUSSEL & NURSE 1986]. Es wurden weder Änderungen der Menge noch des Phosphorylierungsstatus von CDC2 zwischen zwei Mitosen gefunden [SIMANIS 1986a]. Nach Nährstoffentzug und der Akkumulation der Zellen in G1 vor 'Start' findet man das CDC2-Protein jedoch dephosphoryliert und seine Kinaseaktivität auf 10% herabgesetzt. Nach erneuter Nährstoffstimulation findet man nach etwa 3 Stunden, ungefähr zum Zeitpunkt des 'Start'-Übergangs, die ursprüngliche Kinaseaktivität von CDC2 wieder [SIMANIS 1986a]. Das cdc2-Genprodukt könnte demnach Teil des Mechanismus' sein, mit dem Zellen den Übergang vom Wachstum zum Nichtwachstum und umgekehrt regulieren. Solange CDC2 phosphoryliert ist, ist die Kinaseaktivität erhalten, und die Zelle durchläuft den mitotischen Zyklus. Bei Dephosphorylierung verliert CDC2 seine Kinaseaktivität, und der Zyklus wird vor 'Start' gestoppt [SIMANIS et al 1986]. Für CDC25 wurde postuliert, dass es eine Rolle bei der Kontrolle des ras1 und ras2-Gens, beide Homologe der ras-Onkogene, spielen könne. Sie scheinen für die Aktivierung der Adenylatzyklase und damit für ein normales Wachstum notwendig zu sein [ROBINSON et al 1987].

Für die Rolle von cdc2 am zweiten, mitotischen Kontrollpunkt gibt es noch keine Anhaltspunkte. Das cdc2-Gen scheint jedoch eine stark konservierte Funktion zu haben. So konnte gezeigt werden, dass über die Sequenzähnlichkeit von cdc2 und cdc28 hinaus eine cdc2-Mutante von *S.pombe* durch den Einbau des cdc28 Gens von *S.cerevisiae* funktional komplementiert wird [BEACH et al 1982]. Dieselbe Komplementation wurde durch ein homologes Gen einer menschlichen c-DNA-Genbank bewirkt [LEE 1987]. Somit könnte das menschliche cdc2-Homolog eine ähnliche Funktion am R-Punkt haben, wie das Hefe-cdc2-Gen bei 'Start'. An beiden Kontrollpunkten stoppt der Zellzyklus bei Nährstoffmangel oder Pro-

teinsyntheseinhibierung. Im Gegensatz zum Hefe-cdc2-Produkt zeigt das menschliche Homolog P34 Variationen sowohl des RNA- als auch des Proteingehalts während des Zellzyklus' [DURKACZ et al 1986, LEE et al 1988].

Die dosisabhängige Wirkung von CDC25 lässt sich gut durch eine Protein-Protein "Titration" (mit CDC2 ?) erklären. Zwischen CDC25 und dem T-Antigen von SV40 findet sich ein strukturell und von der Sequenz verwandtes Motiv, das auch bei v-myc und c-myc auftaucht, ebenso ist von SV40-T ist eine Art Bindungstitration (mit dem RB-Protein) bekannt [FIGGE & SMITH 1988].

Mutanten weiterer Gene, z.B. *sucl* (13 kD Genprodukt) [HAYLES et al 1986] sowie *cdc13* können *cdc2*-Mutationen ausgleichen. *CDC13* ist ein Cyclinhomolog und offenbar mit *CDC2* assoziiert [SOLOMON et al 1988].

#### 1.4. Der Maturation-promoting-factor MPF

MPF ist eine mitoseinduzierende bzw. meioseinduzierende Aktivität in Zellen während der Mitose und Meiose. Zuerst wurde MPF in meiotischen *Xenopus*-Oozyten beschrieben [MASUI & MARKERT 1971] und an diesen Zellen in der Folgezeit auch am besten untersucht. Im speziellen Fall des Zellzyklus der Amphibienoozyten wird die Zelle aus einem Wartestadium in der meiotischen G2 oder frühen Prophase durch extrazelluläres Progesteron entlassen, und es laufen die weiteren Stadien der meiotischen Zellteilung ab einschliesslich des Abbaus des germinalen Vesikels, Chromosomenkondensation, Spindelformation und Cytokinese des Polarkörperchens. Unter Umständen arretiert die Zelle bei einer zweiten meiotischen Metaphase als unbefruchtetes Ei. Im Laufe des Intervalls erste Prophase bis zweite Metaphase wird der Ablauf der weiteren

Reifung festgelegt. Kurz vor dem Abbau des germinalen Vesikels erscheint die MPF-Aktivität im Cytoplasma, nachgewiesen durch die Injektion kleiner Volumina Cytoplasma in weitere Oozyten, die dadurch ohne Progesteron zum Start der ersten Reifungsprozesse veranlasst werden [MASUI & MARKERT 1971]. MPF ist sehr instabil und hat sich einer näheren Charakterisierung lange Zeit entzogen. MPF ist ein Phosphoprotein, das während der Interphase von Oozyten und mitotischen Zellen in seiner inaktiven Form preMPF vorliegt. Seine Aktivierung, die zunächst von einem Inhibitor verhindert wird, benötigt keine Proteinsynthese vor der Mitose [CYERT & KIRSCHNER 1988, DUNPHY & NEWPORT 1988] und Meiose I, wohl aber vor der Meiose II [SWENSON et al 1986]. P13, das Produkt von *sucl*, kann in Hefe mehrere *cdc2*-Mutationen ausgleichen sowie in *Xenopus* die Aktivität von MPF unterdrücken. P13 könnte damit der gesuchte Inhibitor von preMPF sein. Die Aktivität von MPF beginnt in der frühen G2-Phase, erreicht während der Mitose ein Maximum und verschwindet in der frühen G1-Phase. MPF ist abhängig von  $Mg^{++}$ , hitzelabil und hat eine hohe Affinität zu Chromatin [NEWPORT & KIRSCHNER 1984]. Bis vor kurzem nahm man ein Molekulargewicht von etwa 105 kD an [NEWPORT & KIRSCHNER 1984] (bzw. 300 kD bei Seesternoozyten [KISHIMOTO & KONDO 1986]). Die Hauptaktivität enthält jedoch eine Fraktion mit zwei Polypeptiden von 45 kD und 34 kD. Das 34 kD-Protein besitzt eine Kinaseaktivität für verschiedene Substrate, einschliesslich des 45 kD-Proteins [LOHKA et al 1988] sowie H1. Aufgrund der starken Sequenzähnlichkeit zur H1-Kinase des Seesterns stellt es möglicherweise eine Komponente dieser Kinase dar. [GAUTIER et al 1988, LABBE et al 1988]. Das kleinere Protein, das möglicherweise die kleine Untereinheit eines Oligomers darstellt, hat dieselbe Grösse wie das Produkt des *cdc2*-Gens. Beide, das *cdc2*-Produkt

P34-cdc2 sowie MPF-34, werden von einem Antikörper gegen P34-cdc2 erkannt [GAUTIER et al 1988]. Damit könnte CDC2 ein Bestandteil von MPF sein.

MPF-34 bindet wahrscheinlich nur phosphoryliert an MPF-45 [GAUTIER et al 1988]; ähnliches gilt für das Säugerhomolog von P34-cdc2, P34: während des Zellzyklus nimmt die Phosphorylierungsrate von P34 zu, und nur in phosphorylierter Form bindet es an ein weiteres 62 kD-Protein. Der P34/P62-Komplex mag die Säugerform von MPF darstellen: bei beiden Oligomeren steigt die Kinaseaktivität zu Beginn der Mitose, ist maximal zur Metaphase und sinkt abrupt nach der Zellteilung. Die Inaktivierung geht bei der Muschel *Spisula* einher mit dem Verlust der 62-kD-Untereinheit, wobei noch nicht bekannt ist, ob das durch Proteolyse oder Dissoziation geschieht [DRAETTA & BEACH 1988]. Analog wirkende Faktoren sind mittlerweile bei vielen Spezies gefunden worden. Stellvertretend seien die M-Faktor genannten Aktivitäten bei HeLa-Zellen genannt, die wie MPF Chromosomenkondensation, Abbau der Kernmembran und des Zytoskeletts und den Aufbau der Spindel auslösen und ihre maximale Aktivität beim G2/M-Übergang entfalten [ADLAKHA et al 1985].

### 1.5. Cyclin

Bei *Spisula* findet man zwei Varianten Cyclin A und Cyclin B mit 31% Sequenzähnlichkeit. Sie akkumulieren während der Interphase und werden am Ende jeder Mitose abrupt degradiert, die Oszillation des Cyclin-A/B-Gehalts wird also durch selektive Proteolyse während des Meta/Anaphaseübergangs verursacht [SWENSON et al 1986]. Das *Spisula*-Homolog von CDC2 liegt assoziiert mit Cyclin A oder B vor, somit könnten Cycline weitere Komponenten

von MPF sein. Obwohl die Sequenz von Cyclin-A/B nicht auf eine Kinase hinweist, findet sich in Immunkomplexen von Cyclin-A/B Kinaseaktivität. Die fortschreitende Assoziation Cyclin-A/B/Kinaseaktivität(=CDC2?) könnte damit den MPF-Komplex aktivieren oder zusammen mit anderen Komponenten den MPF-Komplex bilden. Die Proteolyse von Cyclin-A/B könnte den Mechanismus der gleichzeitigen Inaktivierung von MPF darstellen [DRAETTA et al 1989]. In *Drosophila* fand sich eine gewebsspezifisch unterschiedliche Expression von Cyclin A und Cyclin B während der Embryogenese [WHITFIELD et al 1989].

cdc13, das cdc2-Mutationen ausgleichen kann, hat eine deutliche Sequenzähnlichkeit zu Cyclin-A/B [SOLOMON et al 1988]. Möglicherweise ist das System cdc2/cdc13 also äquivalent zu MPF-Cyclin-A/B.

## 1.6. Weitere zellzyklusspezifische Proteine

### 1.6.1. PCNA

Ein zunächst Cyclin genanntes Kernprotein von 36kD wurde als ausschliesslich während der S-Phase synthetisiertes Protein bei mehreren menschlichen, Hamster- und Mauszelllinien in Elektrophoresegelel gefunden [BRAVO & CELIS 1980], d.h. es wird proteolytisch inaktiviert. Später erwies sich seine Identität mit PCNA (proliferating cell nuclear antigen) [PRELICH et al 1987] sowie mit dem Hilfsprotein der DNA-Polymerase  $\delta$  [BRAVO et al 1987]. PCNA kommt ausschliesslich in den Kernen wachsender Zellen vor. Es ist eines der Proteine, die für eine effiziente Replikation des Virus SV40 benötigt werden [PRELICH et al 1987].

#### 1.6.2. Dividin

Dividin ist ein 54 kD Kernphosphoprotein transformierter und normaler menschlicher Zellkulturzellen, das wie PCNA ausschliesslich während der S-Phase wachsender Zellen vorkommt und proteolytisch inaktiviert wird [CELIS & NIELSEN 1986].

#### 1.6.3. Statin

Statin ist ein 57 kDa Kernprotein, das als Marker für nichtwachsende Zellen in ruhenden Fibroblasten und einer Reihe weiterer Gewebezellkulturen gefunden wird. Nach Serumstimulation verschwindet Statin innerhalb von 12-14 Stunden, 4 Stunden vor der DNA-Neusynthese [WANG & LIN 1986].

#### 1.6.4. Sonstige

Weitere Proteine, die rhythmische Expression oder Aktivierung während des Zellzyklus in Zellkulturen zeigen, sind Topoisomerase II [HECK & EARNSHAW 1986], Thymidinkinase, Thymidinsynthetase [COPPOCK & PARDEE 1985], Dihydrofolatsynthetase [MARIANI & SCHIMKE 1985], P55 [BARQUE et al 1985], P68 [CROY & PARDEE 1983], Histone [PARDEE et al 1978], Ornithindecaboxylase, sowie die Onkogenprodukte von fos, myc, ras und p53 [Referenzen in CELIS & NIELSEN 1986].

### 1.7. Wachstumsfaktoren + Onkogene

#### 1.7.1. Mechanismus der Wirkung von Wachstumsfaktoren

Polypeptide, regulatorische Peptide sowie eine Reihe pharmakologischer Substanzen können allein oder synergistisch die Mitogenese in ruhenden Fibroblasten in Kultur starten. Zusätzlich sind Wachstumsfaktoren bei einer Reihe physiologischer und patho-

logischer Prozesse wie Embryogenese, Gewebereparatur und Wundheilung sowie Immunantworten beteiligt.

Im ersten Schritt der Wechselwirkung bindet der Wachstumsfaktor mit hoher Affinität an einen Rezeptor der Zielzelle, welcher daraufhin phosphoryliert und entweder endozytotisch aufgenommen wird oder innerhalb der Membran weitere Prozesse auslöst (z.B. EGF-Rezeptor) [JAMES & BRADSHAW 1984]. Die Rezeptorbindung führt zur Bildung einer Signalkaskade in der Membran und im Cytosol, die im Minutenabstand den Zellkern erreicht. Je nach Wachstumsfaktor beginnt wenige oder viele Stunden später (EGF: 18 Stunden) der Zellzyklus mit DNA-Synthese und Mitose [Referenzen in ROZENGURT 1986]. Die meisten Wachstumsfaktoren wirken parakrin (in Zellnachbarschaft), wenige endokrin (über die Blutbahn, z.B. Insulin, GF-I, GF-II) oder autokrin auf die ausschüttende Zelle selbst (z.B. TGF). Die Rezeptoren einiger Wachstumsfaktoren besitzen eine Kinaseaktivität für Tyrosin (z.B. Insulin-, EGF-, PDGF-Rezeptor) [SMITH & BRADSHAW 1984].

PDGF, FDGF und Bombesin können DNA-Synthese und Wachstum allein und ohne die synergistische Wirkung weiterer Faktoren in 3T3-Zellen einleiten [ROZENGURT 1986].

PDGF ist ein Dimer, dessen zwei Gene drei Varianten bilden können: PDGF-AA, AB, BB. Für diese drei Varianten sind zwei Rezeptoren zuständig. Ein Rezeptortyp bindet alle drei Varianten, einer ausschliesslich BB. Das Verhältnis der beiden Rezeptoren variiert zwischen den Zelltypen [MARX 1988]. Die mitogene Aktivität von PDGF wird durch Reduktion der Disulfidbrücken zerstört. Normales Plasma enthält kein PDGF; injiziertes PDGF hat eine Halbwertszeit von 2 Minuten, sodass die Synthese und Sekretion von PDGF lokal erfolgen muss [ROSS et al 1986]. Eine der ersten Reaktionen auf die Bindung von PDGF ist eine Zunahme des  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$

und  $H^+$ -Fluxes über die Membran, die zu einer Alkalisierung des internen Milieus solange führt, bis durch eine sekundäre Stimulation der  $Na^+/K^+$ -Pumpen der elektrochemische Gradient wiederhergestellt wird. Dieser Schritt scheint essentiell für den weiteren Ablauf der mitogenen Aktivierung zu sein, denn die Antwort auf Wachstumsfaktoren bleibt aus, wenn der intrazelluläre pH oder die  $K^+$ -Konzentration unter bestimmte kritische Werte sinken [POUYSSÉGUR et al 1984]. Nach der schnellen Änderung des Fluxes monovalenter Ionen kommt es zu einem Ausströmen von  $Ca^{++}$ , gespeist aus intrazellulären Vorräten. In der Folge kann man eine Vielzahl von molekularen Änderungen beobachten, von denen hier nur die Aktivierung der Proteinkinase C und eine Anhebung des cAMP-Gehalts genannt seien, wobei die Änderungen an  $Ca^{++}$ , PK-C und cAMP keine obligatorischen Ereignisse für das Wachstum sind [ROZENGURT 1986].

#### 1.7.2. Die Beziehung von Wachstumsfaktoren mit Protoonkogenen und Transkriptionsfaktoren

Es gibt eine auffallende Reihe von Verwandtschaften zwischen Wachstumsfaktoren und Onkogenen: der EGF-Rezeptor ist das homologe Protein zum dem v-erb-b-Produkt [DOWNWARD et al 1983], PDGF ist homolog zum v-sis-Produkt [DOOLITTLE et al 1983], CSF-1 (colony stimulating factor) und v-fms sind signifikant sequenzähnlich [SHERR et al 1985], und dasselbe gilt für den Insulinrezeptor und v-ros [EBINA et al 1985].

Viele Wachstumsfaktoren induzieren ohne Proteinsynthese sehr schnell die transiente Expression von c-fos, c-jun und c-myc. Diese transkriptionale Aktivierung muss unter der Kontrolle konstitutiv vorhandener Proteine stehen - sie könnten das Substrat der durch Wachstumsfaktoren aktivierten Kinasen sein. Die

zellulären Homologe viraler Onkogene aktivieren möglicherweise dann Gene, die für die Zellteilung notwendig sind [ROBERTSON 1988]. So findet sich ein strukturelles Sequenzmotiv von c-myc in cdc25 wieder [FIGGE & SMITH 1988]. Das Produkt von c-jun wurde inzwischen als transkriptioneller Regulator AP1 identifiziert [STRUHL 1987], ein 39 kD-Protein, das mit FOS assoziiert als DNA-Bindungskomplex auftritt. Beide Proteine haben mehrere Phosphorylierungsstellen [ROBERTSON 1988]. Das carboxyterminale Ende von JUN ist zu 44% sequenzähnlich dem Hefetranskriptionsfaktor GCN4, der die Expression mehrerer aminosäuresynthetisierender Enzyme schaltet [VOGT 1987]. Die GCN4 und JUN gemeinsame Bindungssequenz findet sich vor vielen Säugergenen, deren Transkription phorbolsterinduzierbar ist [SHORT 1987].

Innerhalb c-fos gibt es eine Sequenz SRE (serum response element), die sich auch im Aktinogen findet - auch Aktin wird nach Serumstimulation rasch exprimiert -, an die ein 67 kD Transkriptionsfaktor SRF (serum response factor) bindet [MARSHALL 1987].

## 1.8. In gut untersuchten Systemen findet man oft eine multi-kausale Regulation

### 1.8.1. Beispiele

Befunde bei anderen Organismen etwa im Bereich des Zellzyklus, der Differenzierung, der Genregulation usw. lassen sich kaum noch mit einem einfachen linearen Modell in Einklang bringen, bei dem eine eindimensionale Kette von Kausalfaktoren zum endgültigen biologischen Ereignis führt, sondern eher im Sinne eines Regelsystems, bei dem eine multidimensionale Verknüpfung mehrerer Komponenten zu einer kooperativen Regulation führt:

- In *Drosophila* kompetieren die Homöoboxgenprodukte von

*fushi tarazu* (ftz), *paired* (prd), *zen*, *even-skipped* (eve), *engrailed* (en) um fünf 10bp consensus-Sequenzen innerhalb eines 96bp Fragments des Promotors von en. Die transkriptionelle Aktivität des Zielgens hängt exakt davon ab, welche Kombination von Homöoboxproteinen gebunden ist. Dies ist das erste Beispiel für ein synergistisches Zusammenwirken von Transkriptionsfaktoren mit gleicher DNA-Bindungsspezifität. Die Homöoboxproteine interagieren wahrscheinlich mit weiteren Promotorfaktoren. Auf diese Weise kann die Transkription von en sehr fein reguliert werden [HAN et al 1989].

- Die Expression des Zellzyklusgens *ftsZ* in *E.coli* scheint negativ von weiteren Genen desselben Genclusters auf transkriptionaler Ebene reguliert zu sein: von *FtsI*, *FtsQ*, *FtsA* und *FtsZ* selbst [HOLLAND 1987].

- In *E.coli* kodiert der Genort *minB* für die Ausbildung des Septums in der Mitte der Zelle. Mutanten bilden Septen auch nahe dem Zellpol und damit kleine, kugelige Minizellen. *minB* kodiert für drei Genprodukte *MinC* (25kDa), *MinD* (30kDa), *MinE* (10.2kDa), deren Koordination für eine genaue Platzierung des Septums sorgt: *MinC* und *MinD* inhibieren gemeinsam potentielle Teilungsstellen in der gesamten Zelle, während *MinE* topologisch spezifisch *MinC/D* an mittleren Teilungsstellen, nicht jedoch an polaren Teilungsstellen inhibiert [BOER et al 1989].

- In *S.pombe* regulieren die Genprodukte von *wee1*, *cdc2*, *cdc25*, *nim1* sowie möglicherweise *suc1* und *cdc13* ko-

operativ den Zeitpunkt der Mitose, wobei ein Defekt eines Gens in vielen Fällen durch Überexpression eines entsprechenden anderen Gens ausgeglichen werden kann [RUSSEL & NURSE 1987, HAYLES et al 1986].

- Die unterschiedliche Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren wie FTZ während der *Drosophila*-Embryogenese, bei der stufenweise saurere Domänen an Serin und Threonin entstehen, könnte einen feinen Regulationsmechanismus der transkriptionellen Aktivierung darstellen [FITZPATRICK & INGLES 1989].

- Über die mitogene Wirkung von cAMP gibt es sehr viele sich widersprechende Befunde. Möglicherweise konvergieren die drei Signalwege (Wachstumsfaktor-Proteinkinase, PIP3-Calcium-DG, cAMP) zwar auf der Ebene der DNA-Synthese, überlappen jedoch nur teilweise auf der Ebene der Genexpression und Proteinsynthese und haben in Abhängigkeit von Zelltyp und Differenzierung auf der Ebene des Membran-Signaltransfers und der Proteinkinaseaktivierung ganz unterschiedliche Wirkung [DUMONT et al 1989].

Derartige multikausale Kontrollen, wie sie in gut untersuchten Systemen auftreten, müssen auch bei linear scheinbar einfach interpretierbaren Daten im Auge behalten werden.

#### 1.8.2. Die Beziehung von cdc-Genen und Wachstumsfaktoren mit Differenzierungsgenen

Im Sinne der angesprochenen komplexen Regulation seien an dieser Stelle einige verwandtschaftliche Beziehungen zwischen cdc-Genen sowie Wachstumsfaktoren und Differenzierungsgenen erwähnt.

Das dem CDC10-Protein von *S.pombe* entsprechende Protein bei *S.cerevisiae* ist das SW16-Protein. SW16 ist eines der beiden

trans-Aktivatorproteine für das HO-Gen. Das HO-Gen von *S.cerevisiae* codiert für eine Endonuclease, welche den Mating-Typ-Schalter initiiert. Die HO-Transkription erfolgt nur während eines kurzen Zeitabschnitts nach 'Start'. Beide Gene *cdc10* sowie *swl6* enthalten zwei Kopien eines Motivs, das fünffach im *notch*-Gen von *Drosophila*, ebenfalls einem Differenzierungsgen, enthalten ist [BREEDEN & NASMYTH 1987].

Einige Wachstumsfaktoren spielen eine Rolle bei der Zelldifferenzierung. TGF- $\beta$  scheint bei *Xenopus*-Embryos bei der Ausbildung des Mesoderms mitzuwirken [MARX 1988]. Die Sequenzen zweier homöotischer Loci, *notch* in *Drosophila* und *lin12* im Nematoden *Caenorhabditis elegans*, enthalten Ähnlichkeiten mit der Sequenz von präpro-EGF [BENDER 1985].

Eine Zusammenfassung der verwandtschaftlichen Beziehungen von Zellzyklusgenen, Zellzyklusproteinen sowie weiteren Genen und Genprodukten zeigt Abbildung 1.

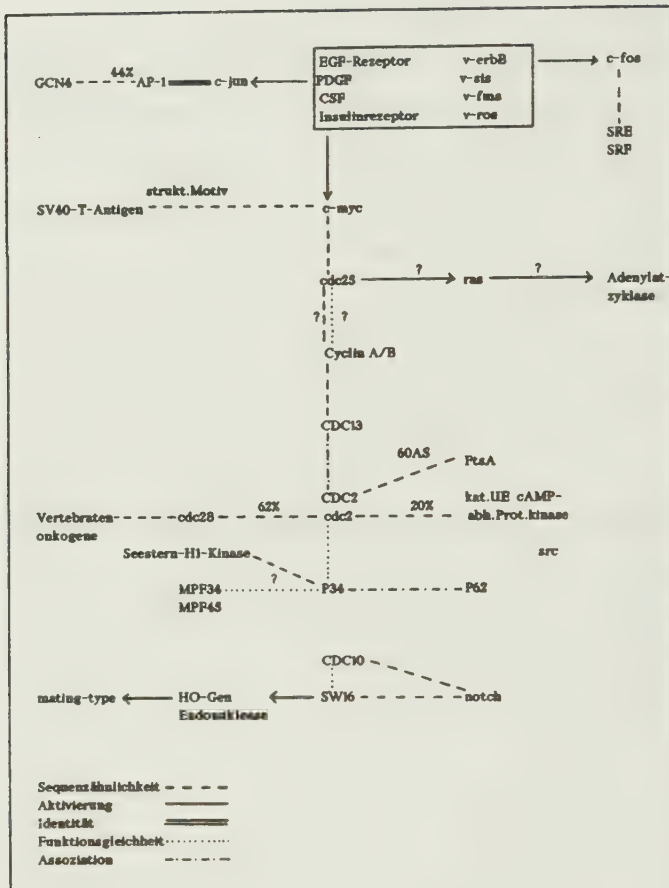


Abbildung 1.  
Verwandtschaftliche Beziehungen von Genen und Genprodukten aus Zellzyklus und Zelldifferenzierung

1.9.        *Physarum polycephalum* als Modellorganismus für die  
Analyse des Zellzyklus

*Physarum polycephalum* gehört zu den Schleimpilzen oder Myxomyceten. Die Myxomyceten nehmen taxonomisch eine Position zwischen Pilzen, Pflanzen und Tieren ein und existieren in drei Lebensformen : erstens den Sporangien oder Sporophoren, 1-2mm hohen Fruchtkörpern, die *Physarum polycephalum* den Namen gegeben haben. Die zweite Form sind die einkernigen Myxamöben von 12-15µm Durchmesser. Die dritte Form sind die einzig bei Myxamöben vorkommenden Plasmodien, eine schleimige Masse Protoplasma, die sich gelegentlich an dunklen Stellen auf nassen, umgestürzten Bäumen findet. Der Übergang von der Amöbe zum Plasmodien sowie vom Plasmodium zu Sporangien (Sporulation) sind irreversible Differenzierungsschritte. Amöben können sich reversibel zu Flagellaten (Schwärmzellen) sowie einkernigen Mikrozysten ausformen; Plasmodien können auch in Form von vielkernigen Makrozysten, dem Sklerotium existieren (Spherulen in Flüssigkultur). Der Lebenszyklus schliesst sich, wenn Sporen auskeimen und sich über die haploiden Stadien der Schwärmzellen und Mikrozysten Amöben verschiedenen Mating-typs bilden, die sich sexuell über eine Zygote zum Plasmodium ausformen. Einige Stämme von *Physarum polycephalum* bilden einen asexuellen Lebenszyklus (Apogamy), z.B. *Colonia* (CL) [SAUER 1986]. Wegen seines komplexen Lebenszyklus stellt *Physarum* ein ausgezeichnetes Modellsystem für Differenzierungsvorgänge dar, wegen der synchronen Mitose im vielkernigen Plasmodium ein sehr gutes Objekt für die Zellzyklusforschung (Abbildung 2).

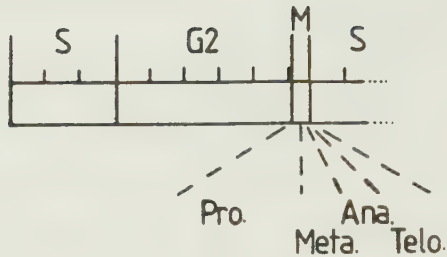


Abbildung 2.

Der Zellzyklus von *Physarum polycephalum*.

S: DNA-Synthese (etwa 3 Stunden), G2: Phase zwischen S-Phase und Mitose M (M: 25-30 min). Mitosephasen: Prophase (15-20min), Metaphase (5min), Anaphase (3min), Telophase (2min)

Hier entfällt die Notwendigkeit einer Synchronisation von aussen mit ihrem Nachteil der Unwägbarkeit von Nebenwirkungen auf die zu messenden Parameter, wie es bei nichtsynchrone Organismen wie Zellkulturzellen, *E.coli* oder *Tetrahymena* der Fall ist.

Die Variation der Zykluszeit der verschiedenen Zellkerne innerhalb eines Plasmodiums ist extrem gering. Mehr als 99% der Kerne teilen sich innerhalb von 5 Minuten; das entspricht etwa 1 % der Zykluszeit von 7 - 10 Stunden [SACHSENMAIER 1981]. Dieser konstante Zyklus kann am einfachsten durch ein deterministisches Modell beschrieben werden, bei dem beispielsweise eine extranukleare 'Trigger'substanz während des Zyklus akkumuliert, durch die schnelle zytoplasmatische Strömung homogen verteilt wird und bei einem Schwellenwert ihrer Konzentration die Mitose auslöst und dabei verbraucht wird [z.B. TYSON & SACHSENMAIER 1985]. Zur Prüfung dieser Hypothese wurden Fusionsexperimente mit Paaren von gleichgrossen Plasmodien aus unterschiedlichen Phasen des Zyklus durchgeführt. Die Kerne des Fusionsplasmodiums synchronisierten sich und teilten sich zu einem Zeitpunkt, der etwa

der Mitte der Partner entsprach, d.h. die Kerne des 'älteren' Plasmodiums teilten sich später, die des 'jüngeren' Plasmodiums früher, als sie es normalerweise getan hätten - ein Befund, der genau einem 'Trigger'-Modell in Form eines Relaxationsoszillators entspricht [LOIDL & SACHSENMAIER 1982].

Das Verhältnis der Mengen von Protein zu DNA erreicht bei der Mitose einen bestimmten Wert, auch bei unterschiedlichen Wachstumsraten [EXENBERGER 1983]. Eine Änderung dieses Verhältnisses, beispielsweise durch Cycloheximid, Hitzepulse, UV- oder ionisierende Strahlung, führt zu einer Verzögerung oder Beschleunigung der nachfolgenden Mitose, um das normale Verhältnis Protein / DNA wieder zu erreichen [TYSON et al 1979, SUDBERY & GRANT 1975, EXENBERGER 1983]. Das setzt eine Grössenkontrolle ähnlich wie z.B. der bei Hefe während 'Start' voraus. Allerdings wären bei einem einfachen Konzentrationsmodell auch die nachfolgenden Mitosen von einer Störung betroffen; tatsächlich haben aber die der Störung ab der übernächsten Mitose folgenden Zyklen wieder die normale Länge [SUDBERY & GRANT 1975, TYSON & SACHSENMAIER 1985]. So wurden geringfügig erweiterte Modelle vorgeschlagen, von denen das Modell des instabilen Aktivators die Befunde am besten erklärt. Nach diesem Modell wird ein instabiler Mitoseaktivator mit einer Rate proportional zur cytoplasmatischen Masse synthetisiert und mit einer Rate 1.Ordnung degradiert. Damit wäre die Aktivatorkonzentration zu allen Zeiten des Zellzyklus konstant. Der Aktivator bindet an Bindungsstellen des Kerns, deren Anzahl der DNA-Menge entspricht. Die Kernteilung würde nach der vollständigen Absättigung der Kernbindungsstellen ausgelöst [WHEALS & SILVERMAN 1982, TYSON & SACHSENMAIER 1985]. Diese Beziehung stellt gleichzeitig eine Grössenkontrolle dar. Nach einer gewaltsamen Anhebung des Verhältnisses Protein/DNA,

beispielsweise durch ionisierende Strahlung, kommt es zu einer Verkürzung der übernächsten Periode, da der Hypothese zufolge weniger 'Kernäquivalente' durch den Aktivator 'titriert' werden müssen. Cycloheximid würde die Aktivatorkonzentration senken und die Mitose verzögern, Proteaseinhibitoren würden die Degradation vermindern und die Mitose beschleunigen. Beides ist der Fall [TYSON et al 1979, eigene Befunde].

Es hat sich als schwierig erwiesen, Zellzyklusmutanten des plasmodialen Stadiums von *Physarum* zu etablieren und auf diese Weise Aufschlüsse über die Steuerung des Zellzyklus zu erhalten [DEE 1982]. Statt dessen hat man häufig Plasmodien auf zyklische Variable untersucht (Tabelle 1).

Tabelle 1

Zyklische und nichtzyklische Variablen des Zellzyklus  
von *Physarum polycephalum* - Plasmodien

| Parameter                 | Peak         | Level | Literatur       |
|---------------------------|--------------|-------|-----------------|
| ADP-Ribosyltransferase    | S            |       | GRÖBNER 1985    |
| AP4A                      | S            |       | WEINMANN 1984   |
| AP4A, AP4G                | -            |       | LAFFLER 1986    |
| ATP                       | mittl.S,     |       |                 |
|                           | mittl.G2,M   | 2     | FINK 1975       |
| cGMP                      | S,späte G2   | 5,3   | LOVELY 1976     |
| dATP,dGTP,dTTP,dCTP       | frühe S      | 4     | FINK 1975       |
| H2A,H2B-Synthese          | S,G2         |       | GRÖBNER 1982    |
| H3,H4,core-Histonsynthese | S            |       | GRÖBNER 1982    |
| H4 Acetylierung           | S            |       | LOIDL 1983      |
| Histon mRNA-Translation   | S            | 22    | LAFFLER 1987    |
| NAD-Pyrophosphorylase     | S            | 3     | SOLAO 1971      |
| NHP                       | Ende G2,S,M, |       | MAGUN 1979      |
|                           | Beginn G2    |       | GRÖBNER 1982    |
| RNase I                   | step M+2-3h  | 2     | BRAUN 1969      |
| Thymidinkinase            | S            |       | GRÖBNER 1984    |
| Thymidylatsynthase        | S            |       | GRÖBNER 1982    |
| cAMP                      | späte G2     | 15    | LOVELY 1976     |
| DNA-Polymerase,Synthese   | G2           |       | MAC NICOL 1987  |
| Glutamatdehydrogenase     | step M+5h    | 1.8   | HÜTTERMANN 1970 |
|                           | -            |       | WEGENER 1981    |
| Histonacetyltransferase   | G2           |       | GOLDERER 1987a  |

# Fortsetzung Tabelle 1

| Parameter                        | Peak           | Level  | Literatur         |
|----------------------------------|----------------|--------|-------------------|
| Histon, core-, ADP-Ribosylierung | frühe G2       |        | GOLDERER 1987b    |
| Histon mRNA-Transkription        | mittl. G2-     |        |                   |
|                                  | mittl. S       |        | LAFFLER 1986      |
| H1-Synthese                      | frühe G2       |        | GRÖBNER 1982      |
| Methionin, S-adenosyl-L-         | M, mittl. G2   | 1.5, 2 | ENGLERT 1985      |
| MYC                              | späte G2       |        | SAUER 1986        |
| NHP                              | Ende G2, S, M, |        | MAGUN 1979        |
|                                  | Beginn G2      |        | GRÖBNER 1982      |
| Phosphorylierung, Kernproteine   | M-2h           | 5      | SHIBAYAMA 1982    |
| Proteinkinasen                   | späte G2       | 2.6    | SHIBAYAMA 1983    |
| Cytochromoxidase                 | M, Abnahme     |        | FORDE 1979        |
| H1 Phosphorylierung              | M              |        | BRADBURY 1973     |
| H4 mRNA                          | M+-1h          | 2      | CARRINO 1986      |
| Kontraktionsrhythmusstop         | Meta+-10'      |        | KESSLER 1985      |
| Methionin, S-adenosyl-L-         | M, mittl. G2   | 1.5, 2 | ENGLERT 1985      |
| pH, Intrazellulär                | M              | +0.5   | GERSON 1976       |
|                                  |                |        | MORISAWA 1982     |
| RNA-Polymerase II, Zytosol       | Pro-Tel        | 10     | SAWADA 1985       |
| RNA-Polymerase II, Kern          | Tel-Pro        | 10     | SAWADA 1985       |
| $\alpha$ -Tubulin mRNA           | M+-2h          | 5      | CARRINO 1986      |
| Tubulinsynthese                  | M              | 30     | LAFFLER 1986      |
| Citratsynthase                   | -              |        | WEGENER 1981      |
| DNA-Polymerase, Aktivität        | -              |        | MAC NICOL 1987    |
| Fumarase                         | -              |        | FORDE 1979        |
| Glukose-6-phosphatdehydrog.      | -              |        | WEGENER 1981      |
| $\beta$ -Glukosidase             | -              |        | SOLAO 1971        |
| Glutamatdehydrogenase            | step M+5h      | 1.8    | HÜTTERMANN 1970   |
|                                  | -              |        | WEGENER 1981      |
| Glutathion                       | -              |        | NATIONS 1986      |
| Glyceraldehydphosphatdehydr.     | -              |        | WEGENER 1981      |
| Hexokinase                       | -              |        | WEGENER 1981      |
| Histidase                        | -              |        | SOLAO 1971        |
| H1 Methylierung                  | -              |        | JERZMANOWSKI 1985 |
| 3-Hydroxyacyl-CoA-dehydrog.      | -              |        | WEGENER 1981      |
| Isocitratdehydrogenase           | -              |        | SOLAO 1971        |
| Laktatdehydrogenase              | -              |        | WEGENER 1981      |
| Malatdehydrogenase               | -              |        | FORDE 1979        |
| Phosphodiesterase, cAMP-, cGMP-  | -              |        | SOLAO 1971        |
| Phosphoglucomutase               | -              |        | WEGENER 1981      |
| Phosphatase, sauer               | -              |        | SOLAO 1971        |
| Proteinsynthese                  | -              |        | TURNOCK 1981      |
| Pyruvatkinase                    | -              |        | WEGENER 1981      |
| rRNA-Transkription               | -              |        | HUNTER 1985       |
| Sukzinatdehydrogenase            | -              |        | FORDE 1979        |
| Superoxiddismutase               | -              |        | NATIONS 1986      |

Tabelle der rhythmischen und nichtrhythmischen Parameter in Plasmodien von *Physarum polycephalum*.

## Fortsetzung Tabelle 1

### Abkürzungen:

M:Mitose, G2:G2-Phase, G1:G1-Phase, S:S-Phase, step: kein Peak, sondern stufenartige Erhöhung, h:Stunden, ' :Minuten, Pro:Prophase, Met:Metaphase, Tel:Telophase, -: keine Periodik.

### Erklärung:

Die untersuchten Substanzen sind in vier Gruppen - S,G2,M,keine Periodik - eingeteilt. Substanzen mit mehreren Peaks werden mehrfach aufgeführt. In der Spalte 'Peak' wird diejenige Phase angegeben, in der es zu einer Zunahme oder Aktivierung des betreffenden Parameters kommt. 'Level' 3 bedeutet z.B. 3-fache Menge zum Zeitpunkt des Peaks. In der Spalte 'Literatur' ist nur der Erstautor genannt.

Keine der hier zusammengestellten Variablen hat sich allerdings durch nachfolgende Experimente als Kandidat für eine Kontrollsubstanz empfohlen.

Die Analyse zweidimensionaler Gele mit Hilfe eines digitalen Bildverarbeitung zeigte unter mehreren hundert Spots fünf zellzyklusspezifische, von denen einer zu Tubulin gehört [PAHLIC & TYSON 1985].

Ein weiterer Ansatz zur Analyse des Zellzyklus ist die Verwendung von Störpulsen, um dem hypothetischen Mitoseauslöser indirekt auf die Spur zu kommen. Dabei stellte es sich zum einen heraus, dass wesentliche Ereignisse der S-Phase in gewissen Grenzen vom Mitosezyklus entkoppelbar sind (Aphidicolin verzögert die Mitose, nicht jedoch die Thymidinkinasesynthese [EON-GERHARDT 1981a]; Cycloheximid oder Hitze kurz vor der Metaphase verhindert die Mitose, nicht aber die S-Phase (tetraploide Kerne) [HERDUGO 1984, WOLF 1979]. Diese Möglichkeit der Entkopplung ist auch bei anderen Organismen bekannt (z.B. SCHLEGEL & PARDEE 1986 bei BHK-Zellen, WARD & LUTGENHAUS 1985 bei *E.coli*). Zum anderen verursachen diverse Inhibitoren eine Verzögerung der Mitose, z.B. Cycloheximid [HERDUGO 1984], Colchizin [HAGINO 1978], Aphidicolin (DNA-Polymerasehemmer) [EON-GERHARDT 1981], Na-Butyrat (Inhibitor

der Histondeacetylase) [LOIDL et al 1981], Mikrotubuliinhibitoren wie Methylbenzimidazolcarbamat und Griseofulvin [EON-GERHARDT 1981b], Entkoppler der oxidativen Phosphorylierung wie Natriumazid oder 2,4-Dinitrophenol [WILLE 1981] oder FdUrd [KAUFFMAN 1982].

Verzögerungen der Mitose können allerdings nicht nur durch die direkte Hemmung eines 'Aktivators' hervorgerufen werden, sondern nachgeschalteter Teile des Zyklus. Interessanter für die Frage nach einem Mitoseauslöser sind Beschleunigungen des Zellzyklus, hierfür kommen nachgeschaltete Elemente nicht in Frage.

Durch Störpulse liess sich keine Beschleunigung des Zellzyklus erreichen, sieht man von der Verkürzung späterer Zyklen nach Na-Butyrat oder Hitze als Zeichen einer Art Überkompensation zur Rückstellung des Protein / DNA-Verhältnisses ab, sowie mit Ausnahme der auf die Plasmodienoberfläche pipettierten Histonphosphokinase [BRADBURY 1973, INGLIS 1976], die eine Beschleunigung von durchschnittlich 20 Minuten erbrachte (bei Applikation bis 2 Stunden vor Metaphase).

Darüberhinaus gab es vier direkte Ansätze, eine mitosebeschleunigende Substanz aus *Physarum* zu isolieren:

- BLESSING und LEMPP bedeckten die Oberfläche von M-90-Plasmodien mit antikörpergereinigten Extrakten aus zwei verschiedenen Phasen. Sie fanden eine Beschleunigung um 35 Minuten, wenn die Donorplasmodien aus der späten G2-Phase waren (45 Minuten vor Metaphase). Keine Beschleunigung zeigte sich bei Donorplasmodien, die die Mitose passiert hatten [BLESSING & LEMPP 1978].
- BREWER sowie OPPENHEIM & KATZIR applizierten lyophilisierte Plasmodien aus späten Phasen auf die Oberfläche von 'frühen' Plasmodien [BREWER 1968, OPPENHEIM &

KATZIR 1971]. Dabei zeigte sich eine maximale Beschleunigung von etwa einer Stunde, wenn die Donorplasmodien 3 Stunden vor der Mitose eingefroren wurden.

- LOIDL applizierte plasmodiale Extrakte während eines kurzen Zeitraums bei der Startfusion von Mikroplasmodien und beobachtete die Wirkung auf die erste Mitose [LOIDL & GRÖBNER 1982]. Die Autoren reinigten eine mitogene Aktivität, die in der späten G2-Phase auftaucht, mit Hilfe einer Immunoabsorbenssäule gegen S-Phase-Proteine etwa um das zehnfache. Diese Aktivität erwies sich als ammoniumpersulfatpräzipitierbar, nichtdialysierbar, hitzestabil bis 90 Grad sowie pronasesensitiv. Die Analyse zweidimensionaler Gele zeigte keine Unterschiede zwischen S- und G2-Extrakten vor und nach der Immunoabsorption [LOIDL & GRÖBNER 1985].

## 1.10. Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es,

1. ein Testsystem für das makroplasmodiale Stadium von *Physarum polycephalum* zu etablieren, das es erlaubt, Hemmstoffe oder zelluläre Extrakte zu allen Zellzykluszeiten zu applizieren.
2. zelluläre Extrakte zu gewinnen und die verschiedenen Zellzyklusphasen mit Hilfe des Testsystems auf das Auftreten einer mitosebeschleunigenden Aktivität zu testen.
3. die Natur einer möglichen beschleunigenden Substanz näher zu bestimmen.

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1. Kultivierung in Schüttelkultur

|                         |       |                                           |
|-------------------------|-------|-------------------------------------------|
| <u>Wachstumsmedium:</u> | 40.0g | Trypton (DIFCO)                           |
|                         | 40.0g | Glucose                                   |
|                         | 6.0g  | Hefereextrakt (DIFCO)                     |
|                         | 8.0g  | $\text{KH}_2\text{PO}_4$                  |
|                         | 8.1g  | Zitronensäure                             |
|                         | 1.2g  | $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ |
|                         | 0.17g | $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ |
|                         | 0.12g | $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ |
|                         | 1.2g  | $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ |
|                         | 0.07g | $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ |

ad 4000 ml mit Bidest, pH 4.6 mit 2M KOH

Häminlösung: 0.5mg/ml Häminchlorid in 1% NaOH

Alle Medien und Geräte wurden vor Gebrauch autoklaviert. Stammkulturen wurden im halbdefinierten Wachstumsmedium auf einem VKS-Schüttler bei 26 Grad und 200g in 50ml eines 1l Erlenmeyerkolben gehalten. Kurz vor Inokulation wurde pro 50ml Medium 0.8ml Häminlösung hinzugegeben. 1ml der Kulturen wurde alle 2 Tage umgesetzt, um Enzystierung zu vermeiden [modifiziert nach DANIEL & RUSCH 1961].

### 2.2. Spherulenbildung und Rekultivierung

Vierteljährlich wurde eine Stammkultur 14 Tage durchgehend geschüttelt und zur Enzystierung gebracht. Die Spherulen wurden 3 min bei 300g abzentrifugiert, auf Filterpapier aufgebracht, getrocknet und bei -80 Grad oder Raumtemperatur aufbewahrt. Zur Rekultivierung wurden die Filterpapiere in 50 ml Wachstumsmedium geschüttelt. In der Regel bildeten sich spätestens nach 14 Tagen Mikroplasmodien; bei den bei Raumtemperatur aufbewahrten Filtern gelang die Rekultivierung sehr viel schneller und problemloser.

### 2.3. Makroplasmodien

Plasmodien einer 2 Tage alten Stammkultur wurden 1 min bei 2000 rpm pelletiert und 1 min bei 2000 rpm in frischem Wachstumsmedium gewaschen. 100-200µl des Pellets wurden auf ein Filterpapier (S+S 1575,8 cm<sup>2</sup>) aufgebracht und 1.5h stehengelassen, um die Mikroplasmodien zu fusionieren. Das Filterpapier wurde in einer Petrischale auf ein rostfreies Drahtnetz aufgelegt, von unten mit Wachstumsmedium befeuchtet und bis zur Messung der Mitose bei 25 Grad inkubiert [modifiziert nach NYGAARD et al 1960].

### 2.4. Bestimmung des Mitosezeitpunktes

Zur Bestimmung der Mitosestadien wurde mit einem Skalpell ein winziges Stück vom Plasmodium abgerissen, auf einen Objektträger aufgebracht, mit einem zweiten Objektträger vorsichtig ausgestrichen, 1 min in 95% EtOH entwässert, mit einem Tropfen 50% EtOH / 50% Glycerol fixiert und bei 400facher Vergrößerung im Phasenkontrast betrachtet [TYSON, pers. Mitt.]. Als Teilungszeitpunkt wurde dabei die späte Telophase festgelegt, d.h. der Zeitpunkt unmittelbar nach der Trennung der Tochterkerne, wenn die Kerne in der Regel noch benachbart liegen, aber bereits eine kreisrunde Form haben. Dieser Moment liess sich auf  $\pm 1$ min genau bestimmen und war damit noch eindeutiger als der Moment der Ausrichtung der Chromosomen kernäquatorial während der Metaphase ( $\pm 2$ min).

## 2.5. Extraktpräparation

|                       |       |                                                     |
|-----------------------|-------|-----------------------------------------------------|
| <u>Extraktpuffer:</u> | 6.5g  | NaCl                                                |
|                       | 0.14g | KCl                                                 |
|                       | 0.2g  | NaHCO <sub>3</sub>                                  |
|                       | 0.01g | NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O |

Zur Gewinnung von Plasmodien aus bestimmten Phasen des Zellzyklus wurden Plasmodien am späten Nachmittag angesetzt (M0) und bei 25 Grad inkubiert. Sie wurden im Zeitintervall M0+14h bis M0+26h, d.h. zwischen der zweiten und dritten Mitose, geerntet. Zu diesem Zweck wurde ein Segment zur Kontrolle abgeschnitten und der Zeitpunkt von Mitose 3 (M3) bestimmt, der Rest des Plasmodiums wurde mit Filterpapier in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 Grad aufbewahrt.

Das aufgetaute Makroplasmodium wurde mit einem Spatel auf Eis in ein UZ-Röhrchen gebracht, 1.5fach w/w Extraktpuffer hinzugefügt, intensiv mit dem Spatel verrührt und 35 min bei 4 Grad und 30000g (Sorvall SM24) zentrifugiert und der Überstand weiterverarbeitet. Das Pellet wurde verworfen.

## 2.6. Injektion

Die Injektionsapparatur bestand aus einem LEITZ-Mikromanipulator mit einem angeschlossenen Schlauchsystem, durch das feindosierter Druck auf die Injektionskapillare ausgeübt werden konnte. Die Kapillaren waren 120mm x 1.2mm / 0.8mm silikonisierte Glaskapillaren (CGF-100-6, AM-SYSTEMS CALIF., Fa.MÜLLER, München) mit oder ohne Filament, die vor dem Ausziehen der Spitze zu dreiviertel mit Injektionslösung gefüllt, an einem Ende mit Fensterkitt abgedichtet und am leeren Ende mit einem 700DC Kapillarzieher (DK-INSTRUMENTS) ausgezogen wurden. Die Spitze wurde eingespannt im Mikromanipulator unter dem Binokular mithilfe eines Skalpells ge-

öffnet.

Die Injektion erfolgte mit mässigem Druck ausschliesslich in die plasmodialen Adern der Plasmodien.

## 2.7. Optimierung des Injektionspuffers

Folgende Puffer wurden auf Injizierbarkeit getestet (alle Mengenangaben gelten für 1l):

1.  
Phosphatpuffer:     3.52g      $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
                         7.26g      $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
2.  
Natriumboratpuffer: 4.77g      $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$   
                         20.5ml     HCl 1M
3.  
Natriumzitat-     12.53g     Zitronensäuremonohydrat  
Natronlaugepuff.: 159.6ml     NaOH 1M
4.  
Ringerlösung 1:     6.5g     NaCl  
                         0.14g     KCl  
                         0.12g      $\text{CaCl}_2$   
                         0.2g      $\text{NaHCO}_3$   
                         0.01g      $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
5.  
Ringerlösung 2:     8.6g     NaCl  
                         0.3g     KCl  
                         0.33g      $\text{CaCl}_2$   
                         0.2g      $\text{NaHCO}_3$   
                         0.01g      $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
6.  
Tris-Puffer:     12.12g     Tris(hydroxymethyl)aminomethan
7.  
Imidazol-HCl-puffer: 6.81g     Imidazol (MERCK)  
                         24.3ml     HCl 0.1N
- 8.9.10.  
Zwitterionische  
Puffer nach GOOD  
[GOOD et al 1966]1: 0.1M     HEPES  
                         0.1M     MES  
                         0.1M     PIPES

11.

Injektionspuffer

|                     |        |           |
|---------------------|--------|-----------|
| nach KUKULIES 1984: | 2mM    | Tris-base |
|                     | 0.2mM  | ATP       |
|                     | 0.5M   | DTT       |
|                     | pH 7.4 |           |

12.

Injektionspuffer

|                 |        |                                        |
|-----------------|--------|----------------------------------------|
| nach UEDA 1978: | 2.25g  | KCl                                    |
|                 | 0.61g  | MgCl <sub>2</sub>                      |
|                 | 0.012g | ATP                                    |
|                 | 1.6g   | Tris-HCl                               |
|                 | 0.1ml  | CaCl <sub>2</sub> 4x10 <sup>-3</sup> m |
|                 | pH 7.1 |                                        |

Alle Stammlösungen wurden, wenn ihre Osmolarität über 300mOsm lag, durch Verdünnen auf etwa 200mOsm, der pH wurde, soweit nicht anders angegeben, auf 6.5, 7.0, 7.5 eingestellt.

Die Injektionstests wurden ohne Farbstoff sowie mit Echtgrün (MERCK, gefiltert) durchgeführt. Injiziert wurde in die plasmoidalen Adern unter dem Binokular bei 30x Vergrößerung.

Ausgewertet wurde nach 1, 2, 4 und 7 Stunden nach folgenden Kriterien: A) injizierte Venen sind vom umliegenden Gewebe freigelegt, abgeschnürt und nicht mehr belebt, Farbstoff ist sichtbar; B) injizierte Venen sind als ergraute Stellen noch erkennbar, Farbstoff ist sichtbar; C) injizierte Venen sind nicht von nichtinjizierten Venen unterscheidbar; Farbstoff ist frei im Plasmodium verteilt bzw. nicht mehr sichtbar.

Die Tests wurden an folgenden Stämmen durchgeführt: Cl-1B8, Cl-1B9, Cl-Mü, Cl-82, M-Gö, F, Tu.

## 2.8. Die Injektion verschiedener Substanzen

Zum Test der allgemeinen Verwendbarkeit der Injektionsmethode wurden beispielhaft verschiedene Substanzen injiziert. Die Substanzen und ihre Konzentrationen waren:

- Aktinomycin D 4.0 x 10<sup>-3</sup> M

- Antipain  $1.5 \times 10^{-3}$  M
- Ap<sub>4</sub>A  $1.0 \times 10^{-2}$  M
- Aprotinin  $1.5 \times 10^{-3}$  M
- ATP  $2.0 \times 10^{-3}$  M
- cAMP  $1.0 \times 10^{-5}$  M
- cGMP  $1.0 \times 10^{-3}$  M
- chlor-phenyl-thio-cAMP  $1.0 \times 10^{-4}$  M
- Glutathion, oxid. 0.05 M
- Glutathion, red. 0.05 M
- Glycerol 3%
- Leupeptin  $1.0 \times 10^{-4}$  M
- PMSF  $1.1 \times 10^{-3}$  M
- Pronase E 10µg / ml

## 2.9. Flow-Zytometrie

Kernisolation: Vorbereitung: Rotor TFG (23ml) bzw. 42.1 (33ml), Warring-Blender-Aufsatz, 8 Zentrifugenröhrchen vorkühlen.

Kernmedium 5x:

|                                                        |                                       |
|--------------------------------------------------------|---------------------------------------|
| 7.63g                                                  | MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O |
| 1.51g                                                  | Tris-base                             |
| 4.75g                                                  | EGTA                                  |
| 162.5ml                                                | Hexylenglykol                         |
| 20ml                                                   | Surfynol 485                          |
| ad 500ml bidest, pH 7.5 mit NaOH. Bei -20 Grad lagern. |                                       |

Gradientenlösung:

|       |               |
|-------|---------------|
| 300ml | Percoll       |
| 75ml  | Kernmedium 5x |
| 840ml | Kernmedium 1x |

1. 2-4 log-Flaschen Mikroplasmodien 2min 200g
2. mit bidest waschen 2min 200g
3. Pellet + 20-25vol Kernmedium 1x
4. 30sec homogenisieren in 100-125ml Portionen in Warring-Blender, Messer umwickelt 20sec 60V
5. Schaum auf Eis 30min setzen lassen
6. 5min 200g ungebremst zentrifugieren
7. Pellet in wenig Kernmedium 1x lösen. Pro UZ-Röhrchen 1.5ml. Je Röhrchen 23ml (33ml) Gradientenlösung hinzufügen. Nach Verschluss schütteln
8. 25min 25000rpm (TFG) 2 Grad, bremsen (Nicht

9. länger, sonst wandert Kernbande zu tief)  
Kernbande mit Pasteurpipette absaugen (pro  
Röhrchen 2x), mit Kernmedium 1:1 schütteln
10. 5min 250g
11. Pellet mit wenig Kernmedium lösen, Kernzahl  
mit Neubauerzählkammer ermitteln

- Athanolfällung: Alle Schritte auf Eis, Lösungen vorkühlen.
12. Kerne in grosses Zentrifugenröhrchen  
überführen
  13. jeweils langsam 1,1,2,5,20ml Kernmedium  
sowie 30ml EtOH techn. hinzufügen und  
schütteln
  14. 5 min 200g ungebremst zentrifugieren
  15. Überstand bis auf 10ml abheben
  16. 5 min 200g ungebremst zentrifugieren
  17. Überstand bis auf 500µl abheben  
Pellet in Eppendorfgefässen bei -20 Grad aufbewahren.

Die so präparierten Kerne wurden mit einem IPP 22 (PHYWE) von Dr.KUBBIES, Uni Würzburg, flowcytometrisch untersucht [KUBBIES et al 1986].

## 2.10. Bestimmung der antibiotischen Wirkung des Extrakts

- Nährlösung:
- |                     |                                 |
|---------------------|---------------------------------|
| 5.0g                | Pepton (DIFCO)                  |
| 1.5g                | Hefeextract (DIFCO)             |
| 1.5g                | Fleischextrakt (MERCK)          |
| 1.0g                | Glucose                         |
| 3.5g                | NaCl                            |
| 3.68g               | K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> |
| 1.32g               | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> |
| ad 1l bidest pH 7.0 |                                 |

- Stammlösungen:
- |                        |                                                       |
|------------------------|-------------------------------------------------------|
| 300µg/ml               | Chloramphenicol                                       |
| 300E/ml                | Penizillin                                            |
| Extrakt (UZ-Überstand) |                                                       |
| UF-5000                | (ultrafiltrierter Extrakt MG<5000,<br>AMICON-Membran) |

- Teststämme:
- Bacillus subtilis*  
*Staphylococcus albus*  
*Escherichia coli*

Von 1-2 tägigen Schrägagarkulturen werden in der Nährlösung Schüttelkulturen angesetzt und diese nach Inkubation 16h 30 Grad mit frischer Nährlösung auf eine OD von 0.18-0.2 (1cm-Küvette, 546nm) verdünnt. In einem qualitativen Vortest wurden 15µl Extrakt auf Agarplatten aufgebracht, mit einer Impföse aus der

Schüttelkultur beimpft und 20h bei 37 Grad inkubiert. Die Wachstumshemmung wird visuell als Ausbildung eines klaren Hofes um den Tropfen bestimmt.

Für den quantitativen Vergleichstest wurden die Stammlösungen mit Nährlösung 1:13,50,200,800,3200 verdünnt, mit 0.02ml Schüttelkultur beimpft und 18h bei 37 Grad inkubiert. Die Hemmkonzentration wird visuell als ausbleibende Trübung bestimmt [nach CRUEGER & CRUEGER 1982].

## 2.11. Extraktdegradation

5U Phosphatase (SIGMA), 5U RNase (SIGMA) sowie 5U Proteinase K (SIGMA), jeweils trägergebunden, wurden in einem Eppendorfggefäß mit 200µl Extrakt-45 pH 7.0 (8.0 bei alkalischer Phosphatase) 1h bei 37 Grad unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Träger wurden in einer Eppendorffzentrifuge abzentrifugiert, der Überstand für einen Injektionstest verwendet.

## 2.12. Vorfiltration mit NAP10 und CENTRISART

Bei der Vorfiltration, dem Pufferaustausch und der Entsalzung wurden Minisäulen NAP-10 (PHARMACIA)) verwendet. Elutionspuffer wurde entsprechend der Probenmenge nach der Formel

$$\text{Verdünnungsfaktor} = 1.5\text{ml} / \text{Probenmenge}$$

verdünnt und die Säule mit 25 ml equilibriert. Die Probe wurde aufgetragen und mit 3 x 1.5ml Elutionspuffer gespült. Die drei Fraktionen wurden mit der Speedvac auf das ursprüngliche Volumen eingeeengt und vor einer Injektion der pH auf 7.0 eingestellt.

Die Vorfraktionierung von 1ml des aktiven Extraktes erfolgte mit CENTRISART-Zentrifugenröhrchen mit MC-5000 Filtern nach der Fir-

menvorschrift. Die eingeengte untere Fraktion mit den Molekülen grösser und kleiner als 5kDa sowie die obere Fraktion mit den Molekülen kleiner als 5kDa wurden auf Aktivität getestet.

## 2.13. Hitzeschock

### 2.13.1. Hitzeschock vor Extraktgewinnung

Plasmodien wurden zu verschiedenen Phasen des Zellzyklus geteilt, eine Hälfte wurde 25min bei 34 Grad inkubiert. Zwei Drittel dieser Hälfte wurden dann in flüssigem Stickstoff für den späteren Aktivitätstest eingefroren, der Mitosezeitpunkt des letzten Drittels sowie der Kontrollhälfte bestimmt.

### 2.13.2. Hitzeschock nach Injektion

Injizierte Plasmodien sowie ihre Kontrollen wurden 2 Stunden nach dem Injektionszeitpunkt 25min bei 34 Grad inkubiert und der Zeitpunkt der nachfolgenden Mitose im Vergleich zu injizierten, nichtinkubierten und nichtinjizierten, nichtinkubierten Plasmodien bestimmt.

## 2.14. Gelelektrophorese

### 2.14.1. Gelelektrophorese nach LAEMMLI / SCHLEICHER

SDS-Gelelektrophorese wurde nach den Methoden von LAEMMLI (1970) und WRAY (1981, Silberfärbung), die Fixierung und Färbung wurde modifiziert nach SCHLEICHER & WATTERSON, was die Auswaschung kleinerer Peptide verhindert [SCHLEICHER & WATTERSON 1983]. Fixierung und Färbung verliefen nach folgendem Protokoll:

Waschen - Fixierung: Gel 30min in 50% MeOH / 12% Essigsäure v/v

3x10min in 10% EtOH / 5% Essigsäure v/v  
 30min in 10% Glutaraldehyd  
 3 x waschen: 20min 5% MeOH / 9% Essigsäure  
 v/v, 10min bidest  
 30min färben  
 5 x 1min bidest  
 entwickeln  
 stoppen in Expressfixiersalz (TETENAL) 0.1%

Färbelösung: A:0.8g AgNO<sub>3</sub> in 4ml bidest  
 (frisch B:21ml 0.36% NaOH  
 ansetzen) 1.4ml 25% Ammoniaklsg.

Entwickler: 0.5ml 1% Zitronensäure  
 0.05ml 38% Formaldehyd  
 unmittelbar vor Inkubation mischen

#### 2.14.2. Gelelektrophorese nach SCHAEgger & VON JAGOW (1987)

Die neuere Methode von SCHAEgger und VON JAGOW versucht ebenfalls, der Problematik der Auswaschung kleinerer Proteine [POEHLING & NEUHOFF 1981, SCHLEICHER & WATTERSON 1983] aus dem Gel während der Fixierung und ausserdem dem Problem des Überladens sowie der geringen Auflösung zu begegnen. Dies geschieht im wesentlichen durch die Verwendung zweier unterschiedlicher Spacergele, von Tricin als nachfolgendem Ion, einer niedrigen Startspannung sowie unterschiedlicher Anoden- und Kathodenpuffer:

Anodenpuffer: 0.2M Tris  
 pH 8.9

Kathodenpuffer: 0.1M Tris  
 0.1M Tricine  
 0.1% SDS  
 pH 8.5

Gelpuffer: 0.3M Tris  
 0.3% SDS

Acrylamid: 48% Acrylamid w/v  
 1.5% Bisacrylamid w/v

Stackinggel 4%: 1ml Acryamidlsg.  
 3.1ml Gelpuffer  
 ad 12.5ml bidest  
 100µl AS  
 10µl TEMED

Spacergel 10%: 6.1ml Acrylamidlsg.  
 10ml Gelpuffer

|           |        |
|-----------|--------|
| ad 30ml   | bidest |
| 100-150µl | AS     |
| 10-15µl   | TEMED  |

Trenngel 16.5%:

|           |              |
|-----------|--------------|
| 10ml      | Acrylamidlg. |
| 10ml      | Gelpuffer    |
| 4g        | Glycerol     |
| ad 30ml   | bidest       |
| 100-150µl | AS           |
| 10-15µl   | TEMED        |

Die Gelgrösse war 150 x 120 x 1 mm. Das Trenngel wird dabei von 1-2cm Spacergel, dieses von 1-2cm Stackinggel überschichtet. Aufgetragen wurden 10-20µl Extrakt/Probenpuffer (1/2). Die Elektrophorese startet bei 30V für etwa 1h um ein sauberes Stacking zu erreichen. Nach Entleerung der Probestaschen wurde die Spannung auf 100V const. erhöht.

## 2.15. Ionenaustauschchromatographie

Als Anionenaustauscher (A) wurde DEAE-Sephacel (SERVA), als Kationenaustauscher (C) AG50W-X8 (BIORAD) in Form von 1.5 x 1.0 cm Säulen benutzt. A wurde mit 0.6M KCl, dann mit Tris 0.01M pH 8.5, C wurde mit 0.6M KCl, dann mit MES 0.01M pH 6.5 equilibriert. Je 400µl Extrakt wurden auf pH 6.5 bzw. 8.5 eingestellt und aufgetragen. Beide Säulen wurden mit 4.0ml des entsprechenden Puffers eluiert und die Eluate aufgefangen, sodann wurden beide Säulen mit 0.6M KCl eluiert und die Eluate wiederum aufgefangen. Alle vier Eluate wurden mit einer Speedvac-Zentrifugenverdampfung auf je 300µl eingeengt. Die Proben wurden dann mit einer NAP10-Minisäule (PHARMACIA) in den Injektionspuffer umgepuffert und entsalzt und erneut eingeengt auf 200µl.

## 2.16. Gelfiltration

### 2.15.1. Gelfiltration mit NAP-Minisäulen

Zur Vorfraktionierung, Entsalzung und Umpufferung wurden NAP-10-Minisäulen (PHARMACIA) verwendet. Es wurden 100-500µl Probe aufgetragen und dreimal mit 1.5ml verdünntem Injektionspuffer gespült. Die entsprechenden Eluate wurden als P,S1,S2 bezeichnet, sie wurden dann mit der Speevac auf das Ursprungsvolumen eingeeengt.

### 2.16.2. Gelfiltration mit TSK-HW40S (MERCK)

Die analytische Fraktionierung erfolgte mit einer 1.0 x 60.0 cm Säule, die präparative Fraktionierung mit einer 1.9 x 80.0 cm Säule TSK-HW40S (MERCK), ein Material, das sehr gute Press-eigenschaften besitzt und globuläre Proteine im Molekulargewichtsbereich von 4000-100 trennt. Die Absorbanzmessung erfolgte mit einem UA5-Monitor (ISCO) bei 280nm, ABS 0.1 sowie 0.5, 5ml/15min Pumpgeschwindigkeit. Als Elutionspuffer diente in der Regel 5-fach verdünnter Injektionspuffer. Bei der präparativen Fraktionierung wurden 5ml-Fractionen aufgefangen und auf 1ml eingeeengt. Als Molekulargewichtsmarker in Vorläufen wurden verwendet: Cytochrom C (12000 Da), ACTH (4567 Da), Mellitin (2847 Da), Gramicidin (2000 Da), Vitamin B12 (1342 Da), Valinomycin (1111 Da), Oxytocin (1007 Da) sowie Tyrosin.

## 2.17. Hochdruckflüssigkeitschromatographie HPLC

Die HPLC wurde mit einer 0.4x0.8.25.0 Nucleosil 300-7.C18-Säule (MACHEREY & NAGEL) durchgeführt, auf die 200µl Probe aufgetragen wurde, die vorher mit TFA protoniert wurde. Es wurde ein Gradient

von 100% A (Tridest / 0.1% TFA) zu 100% B (Acetonitril / 0.1% TFA) gefahren in folgender Abstufung:

8min B 0%  
140min B ansteigend auf 100%  
4min B 100%  
4min B absteigend auf 0%  
8min B 0%

anschliessend erfolgte ein Waschgang:

5min B 0%  
20min B ansteigend auf 100%  
10min B 100%  
4min B absteigend auf 0%  
6min B 0%

Der Gradientenmischer war ein LCC-500Plus (PHARMACIA), die Pumpe P 3500 (PHARMACIA), als Detektor wurde ein Zweiwellenlängendetektor 2141 (LKB) verwendet; gemessen wurde bei 214nm und 280nm sowie Absorbanz 0.1.

## 2.18. Fast-atomic-bombardment Massenspektrometrie (FAB)

Die massenspektrometrischen Untersuchungen wurden an einem KRATOS MS50-TC Massenspektrometer mit RF-Magnet an der GBF Braunschweig durchgeführt. Gemessen wurde mit 30sec/Decade, die Beschleunigungsspannung für die Probe war 8kV; Xenonbeschuss erfolgte ebenfalls mit 8kV. Der Quellendruck war  $10^{-9}$ -Torr. Die Datenanalyse erfolgte mit einem DATA-GENERAL-Computer mithilfe des Datensystems DS-90. Die Probe wurde in DMSO aufgenommen, als Probenmatrix dienten Glycerol, Thioglycerol sowie 3-Nitrobenzylalkohol (NBA).

### 3. ERGEBNISSE

#### 3.1. Optimierung des Injektionspuffers

Die Applikation von Fremdsubstanzen ins nichthungernde Makroplasmodium von *Physarum* per Mikroinjektion ist als Methode bislang nicht etabliert. Um die Mikroinjektion an diesem Organismus einzuführen, wurde ein 'Screening' für mögliche Injektionspuffer durchgeführt.

Zwölf Testpuffer pH 7.0 wurden ohne sowie mit Echtgrün in die Makroplasmodien von sieben *Physarum*-Stämmen injiziert; es wurden somit 168 Kombinationen getestet. Die Injizierbarkeit von Puffern ohne und mit Farbstoff entsprach sich weitgehend, lediglich beim farblosen F-Stamm ist die Verteilung des injizierten Materials mit Farbstoff besser zu beurteilen.

Unter den drei am besten injizierbaren Puffern wurde der pH zusätzlich variiert; es wurden ausser pH 7.0 auch pH 6.5 sowie pH 7.5 getestet.

Als günstigste Kombination erwies sich Puffer 4 - Ringerlösung (Frosch) pH 7.0, - mit dem haploiden Stamm Cl-Mü. Dieser Puffer erwies sich als wesentlich besser injizierbar als die beiden anderen im Zusammenhang mit der Injektion von *Physarum* beschriebenen Puffer 11 und 12, gemessen an den in 2.7. genannten Beurteilungskriterien. Zusätzliche Variationen der Zusammensetzung ergaben eine weitere Verbesserung nach Weglassen des Calciumchlorids. Hier ist bereits nach zwei, spätestens aber vier Stunden nach der Injektion keine Spur des injizierten Materials mehr erkennbar.

Von ausschlaggebender Bedeutung ist aber neben der Zusammensetzung des Injektionspuffers auch das Wachstumsverhalten

des Makroplasmodiums. Als "gut"-wachsende Plasmodien in diesem Sinne gelten schnell wachsende, runde Plasmodien mit einer Periodenlänge von 6.5 bis 9 Stunden bei 25 Grad und einer glatten, soliden, ununterbrochenen Oberfläche. Weniger gut wachsende Plasmodien waren - das galt für alle Stämme - relativ dünne Plasmodien mit unregelmässigem Rand oder netzartiger, durchbrochener Oberfläche und Periodenlängen von mehr als 10 Stunden. Sie liessen sich durchweg schlecht oder überhaupt nicht injizieren: injiziertes Material wurde nicht verteilt, injizierte Venen wurden abgeschnürt.

Die Bedingungen für ein optimales Wachstum konnten nicht vollständig aufgeklärt werden, es traten im Laufe der Arbeit immer wieder Perioden auf, in denen Plasmodien schlecht und damit suboptimal injizierbar aufwuchsen. Wesentlichen Einfluss scheinen neben der Qualität des Mediums folgende Parameter zu haben:

- das Alter der Schüttelkultur (regelmässiges Rekultivieren aus Spherulen erschien günstig)
- die Dichte der Mikroplasmodien in der Schüttelkultur zum Zeitpunkt des Inokulierens (das Umimpfen von 1.0 - 1.5ml alle 48 Stunden bei 25 Grad und 100rpm erbrachte beste Resultate)
- möglicherweise die Qualität des Bidest-Wassers (in einer Periode sehr schlechten Wachstums fanden sich erhöhte Phtalsäurewerte)
- der verwendete Stamm.

### 3.2. Injektion von RNase

Als abschliessender Test für die Injizierbarkeit des Injektionspuffers 5 - Ringerlösung ohne Calciumchlorid - wurde

1U/ml RNase (SIGMA) injiziert. Bereits nach 30min zeigte das gesamte Plasmodium auffallende morphologische Änderungen. Es konnte eine deutlich erhöhte Schleimproduktion beobachtet werden, das Flächenwachstum stoppte, die Farbe änderte sich von gelb nach rotbraun. Die Kerne zeigten auffallende Degenerationserscheinungen und waren nach 2h nur noch schwer zu identifizieren. Diese Beobachtung steht im Widerspruch zu vorangegangenen Injektionsversuchen in anderen Labors, bei denen "konzentrierte" RNase ohne sichtbare Wirkung injiziert wurde [H.W.SAUER, pers.Mitt.].

### 3.3. Intraplasmodiale Synchronie

Die Synchronie der Kernteilung war ein entscheidender Messparameter nachfolgender Untersuchungen; sie wurde regelmässig kontrolliert.

87 gutwachsende Plasmodien bis 5cm Durchmesser zeigten dabei an vier verschiedenen Stellen eine Abweichung des Teilungszeitpunktes von maximal 4min  $\pm$  2.13min. Dieser Wert ist noch genauer als der von SACHSENMAIER genannte Wert von  $\pm$  5min [SACHSENMAIER 1981].

### 3.4. Interplasmodiale Synchronie

Im Gegensatz zur intraplasmodialen Synchronie erwies sich die interplasmodiale Synchronie als schlechter als in der Literatur beschrieben [z.B. LOIDL & GRÖBNER 1982]. Zur Bestimmung der interplasmodialen Synchronie wurde ein Plasmodium zu verschiedenen Phasen in zwei, drei oder vier gleichgrosse Teile getrennt und der Mitosezeitpunkt bestimmt. Die Differenz der Mitosezeitpunkte

ist grösser, je länger das getrennte Wachstum dauert. Sie kann bis 22min betragen bei Plasmodienhälften, die vom Zeitpunkt der Trennung bis zur Mitose 9 Stunden getrennt wuchsen (Abbildung 3).

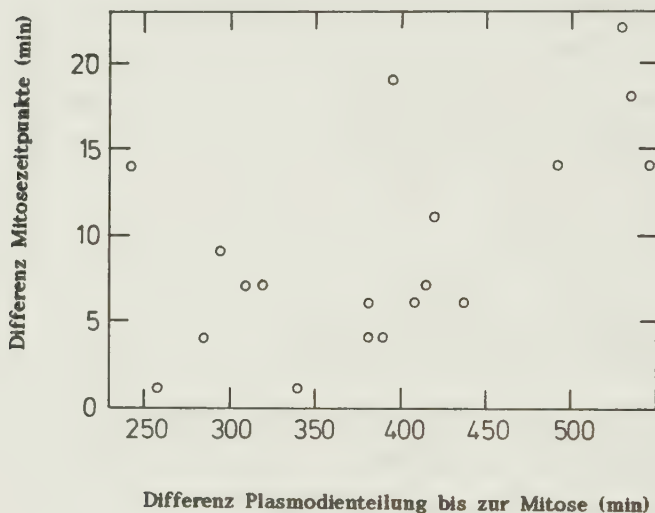


Abbildung 3.  
Interplasmodiale Synchronie von Makroplasmodien *Physarum polycephalum* Stamm CL-Mü nach Zerteilung

Bei Teilung in mehr als 2 Hälften ist die grösste gefundene Differenz der Mitosezeitpunkte aufgetragen.

### 3.5. Wirkung des Injektionspuffers auf den Mitosezeitpunkt

Zur Abschätzung eines möglichen phasenverschiebenden Effekts des Injektionspuffers wurden 20 Plasmodien zu unterschiedlichen Phasen in vier Teile getrennt, zwei davon wurden mit Injektionspuffer injiziert, der mittlere Mitosezeitpunkt zweier Hälften diente als Kontrolle. Der gemittelte Effekt des In-

jektionspuffers auf den Mitosezeitpunkt bestand in einer sechsminütigen Verzögerung  $\pm$  14.2min.

### 3.6. Die Injektion von weiteren Substanzen

Um die allgemeine Verwendbarkeit der Injektionsmethode zu testen, wurden beispielhaft einige weitere Substanzen in Injektionspuffer aufgenommen, injiziert und ihre Wirkung auf die Mitose geprüft. Verwendet wurden im einzelnen (Konzentrationen Abschnitt 2.8.):

- PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid), ein Proteaseinhibitor (vorwiegend Serinproteasen)
- Leupeptin, Aprotinin, Antipain (Peptid-Proteaseinhibitoren)
- Chlor-Phenyl-thio-cAMP, ein cAMP-Analogon
- Glutathion, ein reduzierend wirkendes Tripeptid, das in höherer Konzentration im Cytosol die Ausbildung von S-S-Brücken bei Proteinen verhindert.
- AP<sub>4</sub>A (Di-adenosintetraphosphat). Für AP<sub>4</sub>A wird eine Rolle als Signalnukleotid, das die Rate der Proteinsynthese mit der Initiation der DNA-Replikation koppelt [RAPAPORT & ZAMECNIK 1976] bzw. als Signalkomponente für oxidativen Stress fungiert [BOCHNER et al 1984], diskutiert.
- Pronase E, eine Protease
- Aktinomycin D, ein Inhibitor der RNA-Synthese
- sowie ATP, cAMP, cGMP, Glycerol

Injiziert wurde jeweils im ersten Drittel der Zellzyklusperiode, bei Aktinomycin D wurde zu unterschiedlichen Zeiten des Zellzyklus injiziert.

Das Ergebnis ist in Abbildung 4 und 5 dargestellt.

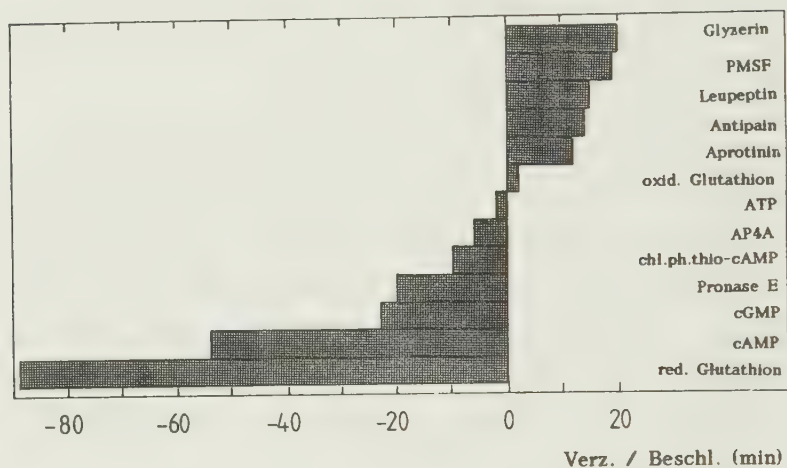


Abbildung 4.  
Mitoseverschiebende Wirkung nach Injektion verschiedener Substanzen. Die Injektionen erfolgten innerhalb des ersten Drittels des Zellzyklus. (Konzentrationen in Abschnitt 2.8).

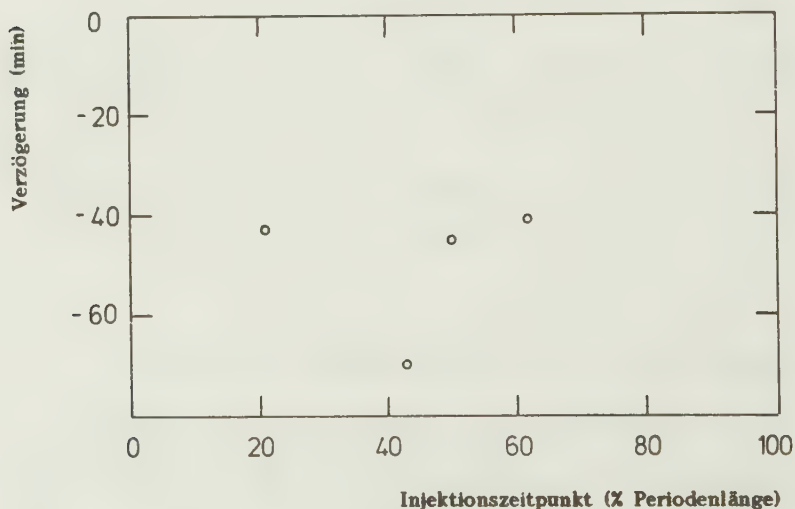


Abbildung 5.  
Injektion: Mitoseverschiebende Wirkung von Aktinomycin D  $4 \times 10^{-3} \text{ m}$

### 3.7. Wirkung der Injektion von Zellextrakten auf den Mitosezeitpunkt

Zelluläre Extrakte, die zu verschiedenen Zeitpunkten im Zeitraum M2-M3 (zwischen zweiter und dritter Mitose) gewonnen wurden (Donorplasmodium), wurden nach der zweiten Mitose einem Akzeptorplasmodium injiziert. In Abbildung 6 ist der mitoseverschiebende Effekt der Injektion in Abhängigkeit von der Phase des Donorplasmodiums aufgetragen. Alle Werte beruhen auf drei- bis vierfach parallelen Injektionen mit zwei Kontrollen pro Plasmodium, d.h. zwei Plasmodien wurden geviertelt, je zwei Viertel injiziert, zwei Viertel dienten als Kontrolle und wurden nur mit Injektionspuffer injiziert. Als Kontrollmitose wurde der gemittelte Wert der beiden Kontrollen benutzt, die Verschiebung des Mitosezeitpunkts von drei bzw. vier injizierten Vierteln wurde ebenfalls gemittelt.

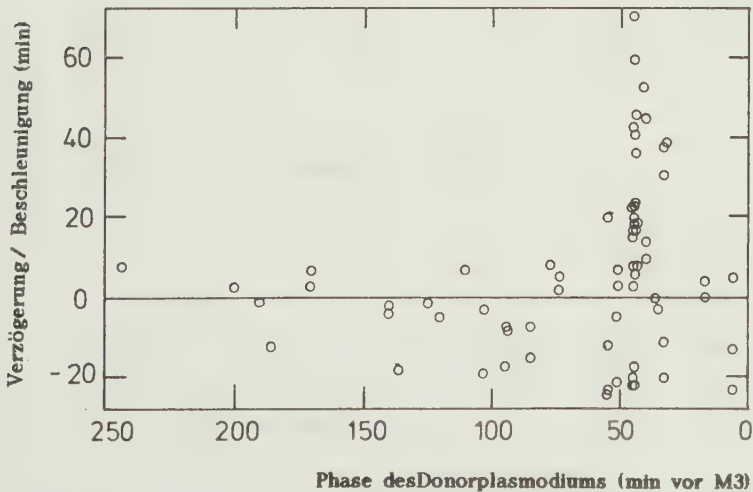


Abbildung 6.  
Mitoseverschiebende Wirkung der Injektion zellulärer Extrakte aus verschiedenen Phasen des Zellzyklus

Im Zeitraum etwa 55 bis 30 Minuten vor der Mitose (des Donorplasmodiums) hat der Zellextrakt eine beschleunigende Wirkung auf den Zellzyklus. Zu anderen Zeiten streut die Wirkung zwischen etwa 10 Minuten Beschleunigung und etwa 15 Minuten Verzögerung, liegt also im Rahmen des festgestellten Auseinanderdriftens von getrennten Plasmodienhälften.

Die Wirkung während der "aktiven" Phase (55-30 Minuten vor M3) streut sehr viel stärker von etwa 20 Minuten Verzögerung bis etwa 70 Minuten Beschleunigung.

Es wurde deshalb der Zeitpunkt der Injektion genauer betrachtet. Die Werte aus der "aktiven" Phase wurden gegen die Phase des Akzeptorplasmodiums zum Injektionszeitpunkt aufgetragen (Abbildung 7).

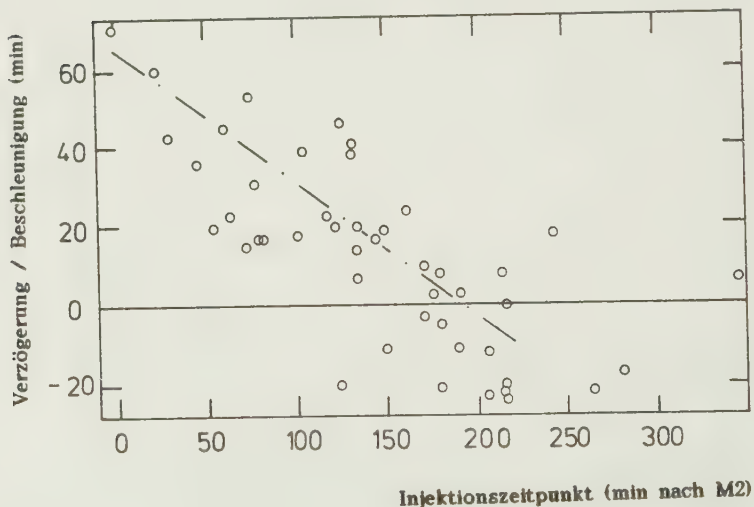


Abbildung 7.

Die Wirkung von Extrakten aus M3-30 bis M3-50 als Funktion des Injektionszeitpunktes

Es zeigte sich tendenziell, je später die Injektion innerhalb des Zeitraums M2 bis M3 erfolgte, desto geringer war der beschleunigende Effekt des Extrakts. Die Wirkung ist bei schnellwachsenden Plasmodien ungefähr 180 Minuten nach M2 beendet, also ziemlich genau nach dem Ende der dreistündigen S-Phase [HALL & TURNOCK 1976]. Da die Periodenlänge M2 bis M3 etwa 7-9 Stunden betrug, entspricht das einem Injektionszeitraum bis 4 - 6 Stunden vor M3. Der beschleunigende Effekt scheint aber nicht auf die S-Phase begrenzt zu sein: durch Inkubation des Plasmodiums bei 21 Grad wurde die Periodenlänge auf 11 Stunden heraufgesetzt. Die Injektion eines aktiven Extrakts 5.5 Stunden nach M2, also ausserhalb der S-Phase, ergab eine mittlere Beschleunigung von 43 Minuten.

Im Gegensatz zu Abbildung 7 wurden in Abbildung 8 alle Injektionsexperimente herausgenommen, die ausserhalb des Zeitraums M2+180min erfolgt waren. Es ergibt sich qualitativ das gleiche Bild, lediglich die starke Streuung während der "aktiven" Phase ist verschwunden. Die Extrakte aus dieser Phase zeigen eine durchschnittliche Beschleunigung des Zellzyklus um  $30 \pm 18$  Minuten, die aus allen anderen Phasen eine durchschnittliche Verzögerung um  $4 \pm 13$  Minuten.

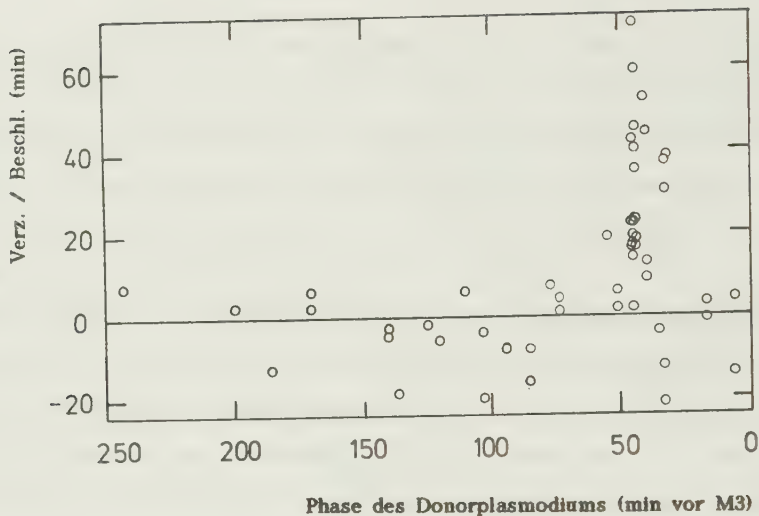


Abbildung 8.  
Mitoseverschiebende Wirkung von zellulären Extrakten aus verschiedenen Phasen des Zellzyklus. Injektion innerhalb des Zeitraums 0-3 Stunden nach Mitose 2 des Akzeptorplasmodiums.

### 3.8. Wirkung eines Hitzeschocks

#### 3.8.1. Hitzeschock während der aktiven Phase

Um den Effekt eines Hitzepulses auf die "aktive" Phase zu bestimmen und möglicherweise Rückschlüsse auf Synthese oder Degradation einer beschleunigenden Substanz zu gewinnen, wurden zwei Drittel eines Plasmodiums einem Hitzepuls von 25min 34 Grad ausgesetzt. Die Hälfte des hitzegeschockten Teils wurde nach dem Puls in Stickstoff eingefroren und zur Extraktgewinnung verwendet, die andere Hälfte diente als Kontrolle für den Effekt des Hitzepulses im Gegensatz zum nichterhitzten Drittel. Den Vergleich der Mitosezeitpunkte zwischen unbehandeltem und erhitztem Plasmodienteil zeigt Abbildung 9. Der mitoseverzögernde Effekt steigt bis zur späten G2-Phase an; nach etwa 30-40 Minuten vor

der Mitose hat der Hitzepuls einen sehr viel geringeren Effekt auf den folgenden Mitosezeitpunkt. Das entspricht den Ergebnissen aus der Literatur [BREWER 1968, CARRINO 1985]. Eines der so behandelten Plasmodien befand sich zu Beginn des Hitzepulses 62min vor der dritten Mitose. Der daraus gewonnene Extrakt hatte eine mitosebeschleunigende Wirkung von 12 Minuten. Ein Hitzepuls scheint die hypothetische Synthese oder Aktivierung deutlich zu beeinträchtigen.

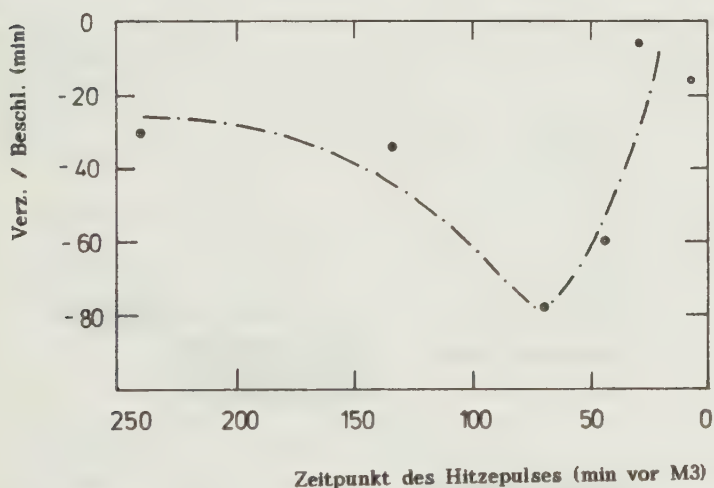


Abbildung 9.  
Verzögerung der Mitose durch einen Hitzepuls als Funktion der Phase

### 3.8.2. Hitzeschock 2 und 4 Stunden nach Injektion

Um möglicherweise Rückschlüsse auf den Wirkmechanismus des injizierten aktiven Extraktes ziehen zu können, wurden Hitzepulse nach Injektion appliziert.

Zwei mit phasenverschiebendem Extrakt injizierte Plasmodien wurden 2 Stunden nach Injektion, zwei weitere vier Stunden nach

Injektion einem Hitzepuls von 34 Grad für 25 Minuten ausgesetzt. Der Mittelwert der Beschleunigung im ersten Fall betrug  $34 \pm 12$  Minuten, im zweiten Fall  $29 \pm 6$  Minuten. Ein Hitzepuls während der Interphase nach Injektion scheint somit die beschleunigende Wirkung des Extraktes nicht oder kaum zu beeinträchtigen.

### 3.9. Einleitende Versuche zur Charakterisierung einer zellzyklusbeschleunigenden Aktivität

#### 3.9.1. Stabilität des aktiven Extrakts

Um den Extrakt genauer auf seine beschleunigende Substanz untersuchen zu können, bedarf es insbesondere einer längerfristigen Aufbewahrungsmöglichkeit, da die permanente Gewinnung frischer Plasmodien nicht möglich ist.

Mit dem Ziel einer weiteren Aufreinigung wurde die Stabilität der Aktivität getestet: Extrakte aus der Phase  $45 \pm 5$  Minuten vor M3 wurden lyophilisiert, präzipitiert, eingefroren, erhitzt. Das Ergebnis ist in Abbildung 10 dargestellt.

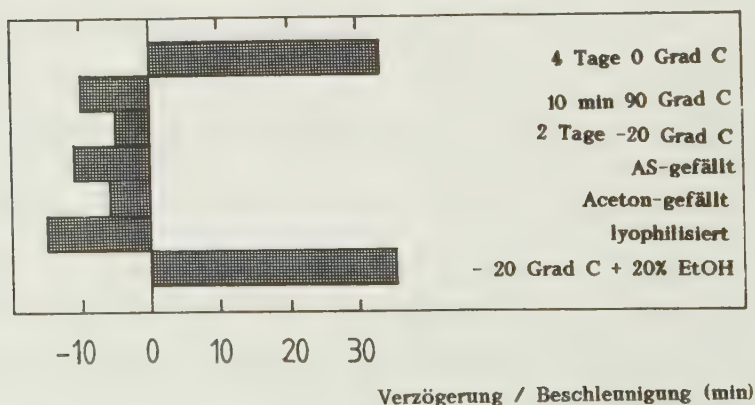


Abbildung 10.

Stabilität des Extraktes: Aktivität nach Weiterbehandlung  
Die Aktivität bleibt nach Lyophilisieren, Kochen, Gefrieren und

Fällen nicht erhalten. Als einzig gangbare Konservierungsmöglichkeit erwies sich die Aufbewahrung mit 20 % Äthanol im flüssigen Zustand bei minus 20 Grad. Zur Weiteruntersuchung wurde Äthanol 3 Stunden in der Speedvac abgedampft und das Ausgangsvolumen mit bidest wiederhergestellt.

### 3.9.2. Degradationsversuche

Zur weiteren Charakterisierung wurden Degradationsversuche mit immobilisierter Proteinase K, alkalischer Phosphatase, RNase durchgeführt. Hierzu wurden 200µl Extrakt aus der Phase 45+-5min vor M3 eine Stunde bei 37 Grad mit jeweils 5U Enzym inkubiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 11 dargestellt:

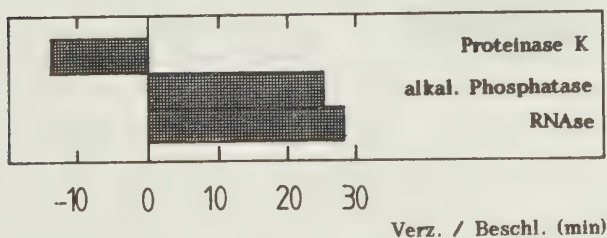


Abbildung 11.

Aktivität des Extraktes M3-45 nach Degradation mit immobilisierter Proteinase K, RNase, alkalischer Phosphatase

Die Aktivität ist nach Inkubation mit Protease verschwunden, nach Inkubation mit RNase und alkalischer Phosphatase bleibt sie erhalten.

### 3.9.3. Vorfiltration mit NAP-10 Minisäulen und CENTRISART

Die Trenngrenze der NAP-10 Minisäulen liegt nach Firmenangaben bei etwa 4000 Da für DNA, die der CENTRISART-Ultrafiltrationsröhrchen bei 5000 Da für globuläre Proteine. Im Fall der Minisäule wurden 0.2-1.0ml Extrakt aufgetragen, mit entsprechend verdünntem Injektionspuffer vier 1.5ml Fraktionen aufgefangen und vor der Injektion auf das ursprüngliche Volumen eingeeengt. Im Fall des Filtrationsröhrchens wurde 1ml Extrakt filtriert. Die Ergebnisse der Vorfraktionierung sind in Abbildung 12 dargestellt.

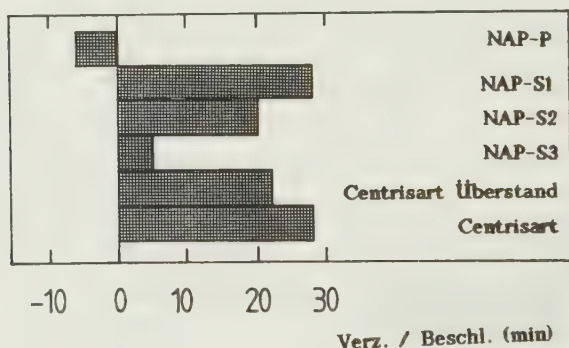


Abbildung 12.

Vorfraktionierung des Extraktes M3-45 mit NAP-10-Minisäulen und CENTRISART Filtrationsröhrchen. Dargestellt ist die Aktivität der ersten 4 NAP-Fraktionen (P,S1,S2,S3), des Centrisart-Überstandes (Filtrat) und des Centrisart Pellets

Im Falle der NAP10-Minisäulen befinden sich Proteine über 4000 Da in der ersten 1.5ml Fraktion, die aktive Substanz in der zweiten 1.5ml Fraktion. Im Falle der Centrisart-Filterröhrchen befindet sich die aktive Substanz sowohl im Überstand als auch unterhalb des Filters. Beides lässt für die aktive Substanz auf ein Molekulargewicht kleiner als 4000-5000 Da schließen.

### 3.10. Analytische SDS-Gelelektrophorese

Da das Molekulargewicht der aktiven Substanz aufgrund der Vorfraktionierung unter 5000 Da liegt und es sich nach den Degradationsversuchen um ein Protein handeln könnte, wurde eine analytische Trennung des Extrakts per SDS-Gelelektrophorese durchgeführt.

Zur gelelektrophoretischen Trennung von Peptiden mit einem  $MG < 8000$  ist die gängige Methode von LAEMMLI mit der Fixierung und Färbung nach WRAY et al nicht geeignet. Kleine Proteine werden nur ungenügend scharf getrennt und zum grossen Teil beim Färben ausgeschwemmt [POEHLING & NEUHOFF 1981, SCHLEICHER & WATTERSON 1983, SCHAEgger & VON JAGOW 1987].

Zum Vergleich der Peptidmuster aus verschiedenen Zellzyklusphasen galt es zunächst, eine Methode zu suchen, die auch kleine Proteine erfasst. Sie fand sich in der Methode von SCHLEICHER & WATTERSON, die im wesentlichen auf der Verwendung von Glutaraldehyd als vernetzendem Fixativ beruht. Geringfügige Verbesserungen in der Trennschärfe scheint die aufwendigere Methode nach SCHAEgger & VON JAGOW zu ermöglichen; beide Methoden wurden geringfügig modifiziert und auch kombiniert angewendet.

Zum Vergleich wurden Extrakte aus den Zellzyklusphasen -180min, -120min, -90min, -65min, -45min, -25min, -5min, +15min, bezogen auf die dritte Mitose, verglichen. Aufgetragen wurden 10-20  $\mu$ l Extrakt, der mit Probenpuffer 1/2 verdünnt war. Es zeigten sich keine wesentlichen Unterschied der Muster der Proteine mit einem Molekulargewicht kleiner als 12 kDa (Abbildung 13).

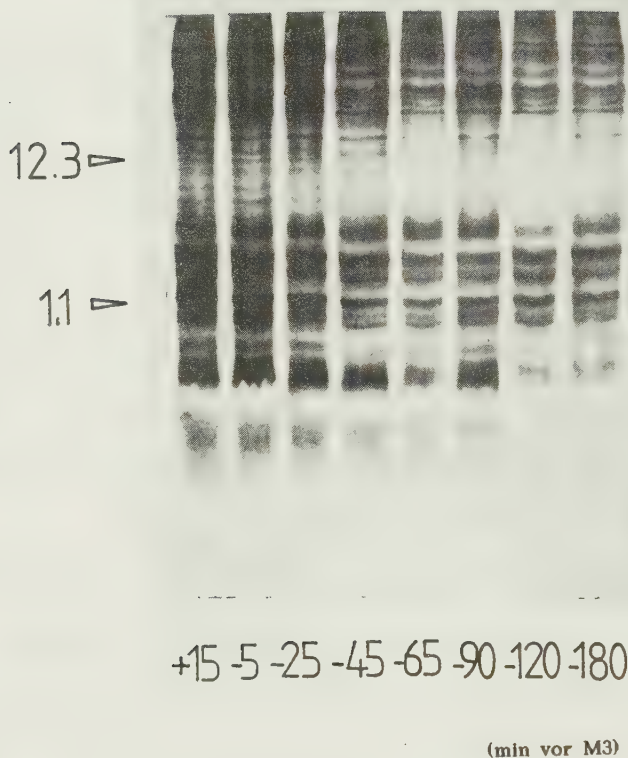


Abbildung 13.

SDS-Gel von Extrakten aus verschiedenen Zellzyklusphasen. Trennung nach der Methode von SCHÄGGER & VON JAGOW, Fixierung und Färbung modifiziert nach SCHLEICHER & WATTERSON

### 3.11. Kernfluoreszenz einer asynchronen Variante

Im Verlauf der Untersuchungen entstand eine asynchrone Variante des Stammes CL-Mü. Sie zeichnete sich bei normaler Grösse (bis 4.5cm Durchmesser) durch eine starke Varianz des Zeitpunktes der Kernteilung von Ausstrichen aus, die an unterschiedlichen Stellen desselben Plasmodiums abgenommen wurden (bis 38 Minuten Differenz anstatt 4 Minuten). Sie wies zudem eine deutlich verlängerte Mitose von den ersten Anzeichen der Prophase bis zur Teilung von

etwa 40 Minuten statt normaler 30 Minuten auf.

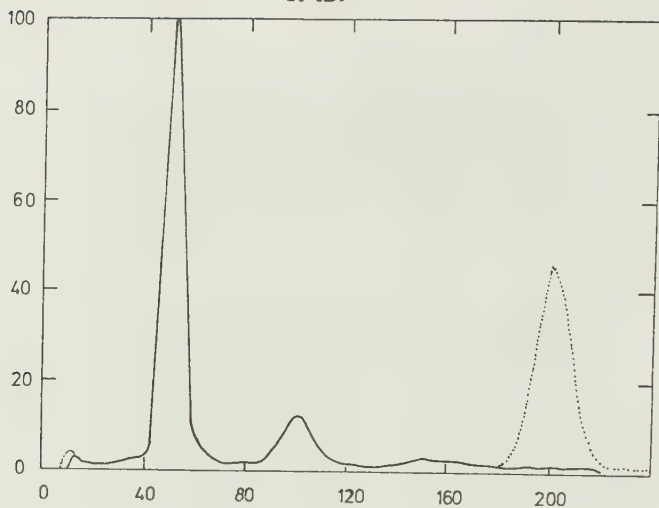
Durch Enzystierung, Aufbewahrung auf Filterpapier und erneute Rekultivierung konnte die Asynchronie nicht behoben werden. Nach Sporenbildung auf Hungeragar und erneuter Rekultivierung zeigte sich wieder normale Synchronie.

Spherulen dieser Variante wurden für weitere Untersuchungen konserviert.

Um festzustellen, ob diese Asynchronie möglicherweise in Folge einer erhöhten Mixoploidisierung auftrat, die man bei C1 sowie anderen Stämmen nach langer submerser Kultivierung beobachtet hat [KUBBIES et al 1986] wurden Kerne aus Mikroplasmodien isoliert und flowzytometrisch untersucht (Abbildung 14).

rel. Anzahl Zellen (%)

Cl-1B9



Cl-Mü-asy

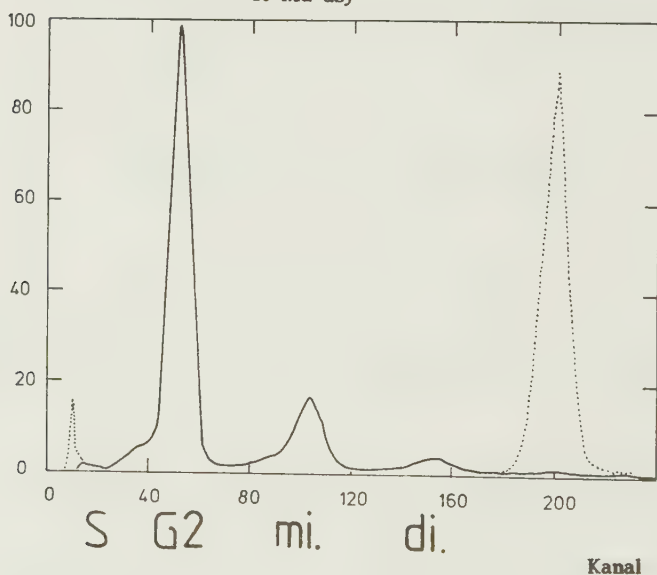


Abbildung 14.

DNA-Fluoreszenz von Mikroplasmodienkernen einer asynchronen Variante Cl-Mü-asy im Vergleich mit Cl-1B9. Die gestrichelte Kurve enthält die Fluoreszenz von Hämoglobin (Mengenstandard). S: haploide Kerne in der S-Phase, G2: haploide Kerne in der G2-Phase, Mi:mixoploide Kerne, Di: diploide Kerne

Es zeigte sich eine leichte Erhöhung der Mixoploidie bei den Kernen der asynchronen Variante Cl-Mü-asy gegenüber dem Kontrollstamm Cl-1B9.

### 3.12. Eine antibiotische Aktivität des Extraktes

Bei einem Standardtest auf proteolytische Aktivität (Merck 582433) wurden einige Platten versehentlich kontaminiert. Lediglich um die Extraktproben (15µl) bildet sich kleine Höfe (etwa 4mm) ohne Bakterienwachstum. Zur Bestimmung einer möglichen antibiotischen Aktivität wurde zunächst in einem qualitativen Hemmtest auf Agar die Wachstumshemmung mit definierten Stämmen geprüft. 15µl Extrakt hemmten das Wachstum von *Staphylococcus albus* sowie *Bacillus subtilis* auf einen Radius von etwa 2.5mm, nicht jedoch das von *Escherichia coli*. In einem quantitativen Vergleich mit Chloramphenicol und Penicillin wurde die Wachstumshemmung auf *E.coli*, *S.albus* und *B.subtilis* bestimmt. Das Ergebnis zeigt Abbildung 15.

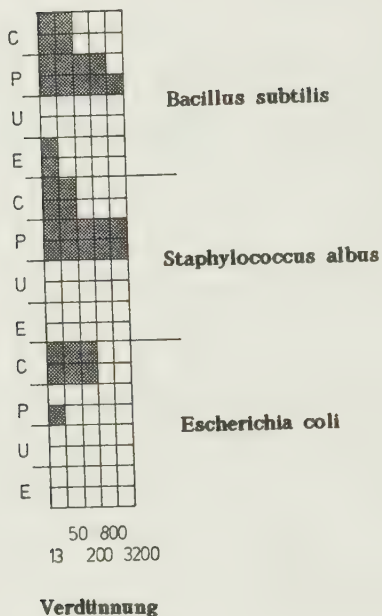


Abbildung 15.

Wachstumshemmende Wirkung des Extraktes auf *B. subtilis*, *S. albus*, *E. coli* im Vergleich zu Chloramphenicol (C) und Penicillin (P). U : Ultrafiltrierter Extrakt (MG<5000 Da), E : Gesamtextrakt. Es wurden jeweils Doppeltests durchgeführt. Eine Wachstumshemmung ist schraffiert gekennzeichnet.

Hier ist lediglich im Falle des ungefilterten, 1:13 verdünnten Extrakts eine leichte Wachstumshemmung auf *B. subtilis* zu beobachten, die etwa 6µg/ml Chloramphenicol oder 0.375E/ml Penicillin entspricht.

### 3.13. Ionenaustauschchromatographie

Für weitere Reinigungsschritte ist es sinnvoll, eine mögliche Ladung oder Nichtladung der aktiven Substanz zu kennen, um mit präparativer Ionenaustauschchromatographie einen Grossteil nicht-aktiver Bestandteile des Extrakts zu entfernen. Deshalb wurde zunächst eine analytische Ionenaustauschchromatographie durch-

geführt.

Je 400µl eines aktiven Extraktes wurden auf einer Anionenaustauschersäule sowie einer Kationenaustauschersäule eluiert, über NAP10 umgepuffert, auf die Hälfte des Originalvolumens eingeengt und durch Injektion auf eine mitoseverschiebende Wirkung getestet. Die Aktivität fand sich im ersten Eluat, nicht in dem mit hohem Salz aufgefangenen Eluat. Hierbei ergab sich im ersten Fall (A) eine Beschleunigung der Mitose um 33 Minuten, im zweiten Fall (C) um 44 Minuten. Der aktive Teil des Extrakts adsorbierte also auf beiden Materialien nicht oder geringfügig auf dem Anionenaustauscher.

### 3.14. Gelfiltration

Zum Zweck einer weiteren Reinigung und der Molekulargewichtsbestimmung der aktiven Substanz wurde eine präparative Gelfiltration durchgeführt. Dazu wurden 13 Plasmodien aus der Phase 41 bis 50 Minuten vor Mitose 3 gesammelt und zu 2.2ml Extrakt verarbeitet. Es wurden 88 Fraktionen à 5ml aufgefangen, von denen Fraktion 16-45 nach Einengung auf ihre Aktivität getestet wurden. Das Ergebnis ist in Abbildung 16 dargestellt.

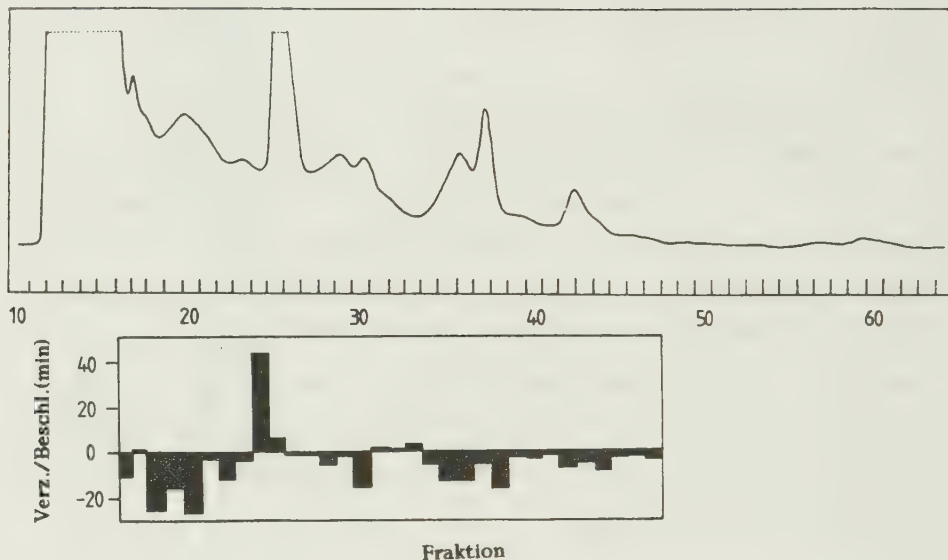


Abbildung 16.  
 Präparative Gelfiltration eines aktiven Extrakts. Obere Kurve :  
 Absorbanz. Untere Kurve : Aktivität der einzelnen Fraktionen.

Der Hauptteil der Aktivität fand sich in Fraktion 24 mit einer Beschleunigung der Mitose um 43 Minuten, eine Restaktivität fand sich möglicherweise in Fraktion 25 mit einer Beschleunigung um 6 Minuten. Das Molekulargewicht liegt bei  $2500 \pm 300$  kDa. Eine genauere Aussage ist nicht möglich, da die Referenzsubstanzen teilweise widersprüchliche Ergebnisse lieferten (die Gelmatrix ist offensichtlich in Bezug auf Ladung oder Hydrophobizität nicht vollkommen wechselwirkungsfrei).

Weitere präparative Trennungen wurden mit den Extrakten M3-150 $\pm$ 20, M3-75 $\pm$ 5, M3-25 $\pm$ 5 durchgeführt. Die Elutionsprofile verschiedener Läufe waren sehr gut reproduzierbar und nahezu deckungsgleich, z.B. befand sich in allen Fällen in Fraktion 25 ein gelbes Pigment. Die Fraktionen 20-30 wurden eingengt und bei -20 Grad mit 20% EtOH aufbewahrt. Einige Fraktionen wurden mit HPLC weiter untersucht.

### 3.15. HPLC (Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie)

Während bei der Gelfiltration die Trennung nach Grösse des Moleküls erfolgt, wird bei der HPLC nach dem Grad der Hydrophobizität getrennt. Auf diese Weise ist eine weitergehende Aufreinigung von einzelnen Fraktionen der Gelfiltration möglich. Die Benennung der Fraktionen erfolgte nach dem Schema 'Phase-Fraktionsnummer', d.h. 45-24 bedeutet Fraktion 24 des Extraktes M3-45±5. Untersucht wurden die Fraktionen 25-24, 45-23, 45-24, 45-25, 75-24. Die Ergebnisse zeigen die Abbildungen 17 und 18.

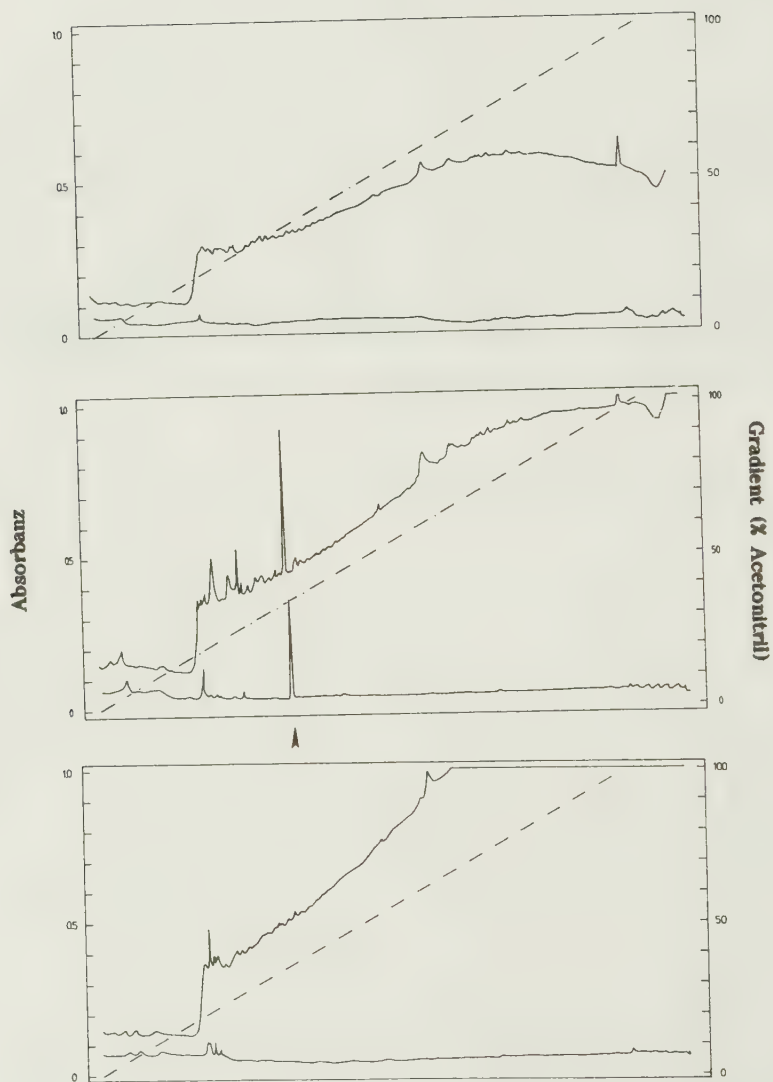


Abbildung 17.

HPLC der Fraktionen 75-24 (oben), 45-24 (Mitte), 25-24 (unten). Obere Kurve: 214nm. Untere Kurve: 280nm. Gestrichelte Kurve: Gradient (%Acetonitril). Das Ansteigen der Kurve 214nm beruht auf der Eigenabsorbanz von Acetonitril.

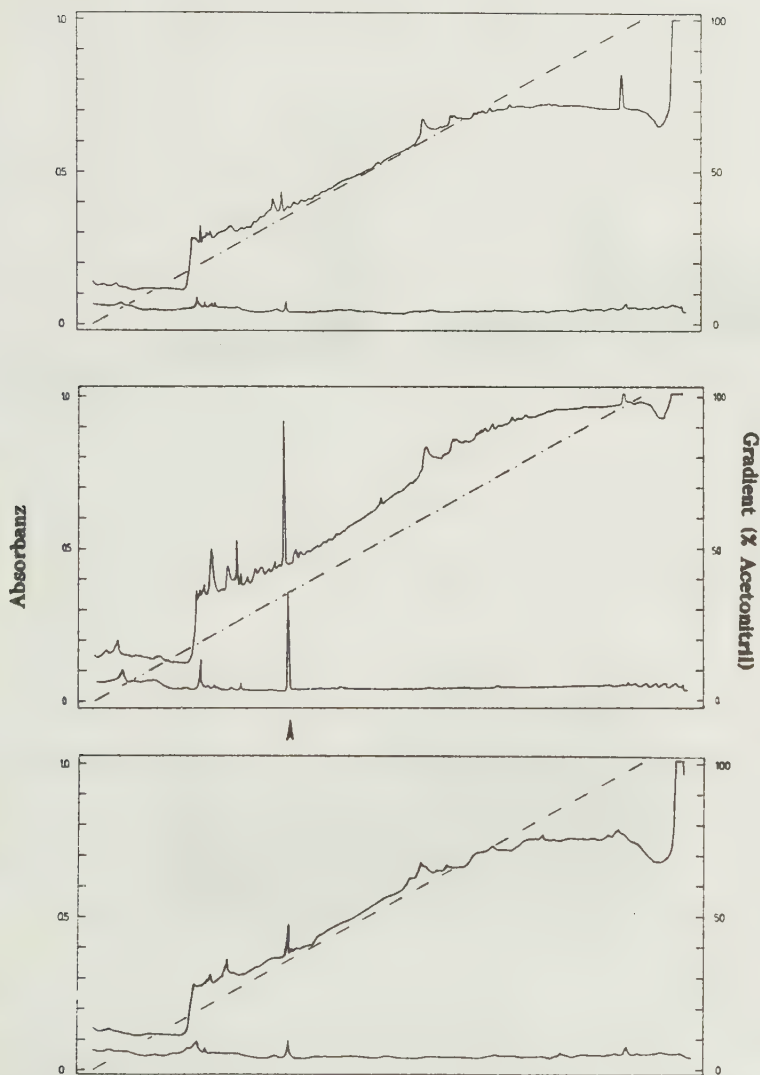


Abbildung 18.

HPLC der Fraktionen 45-23 (oben), 45-24 (Mitte), 45-25 (unten). Obere Kurve: 214nm. Untere Kurve: 280nm. Gestrichelte Kurve: Gradient (%Acetonitril). Das Ansteigen der Kurve 214nm beruht auf der Eigenabsorbanz von Acetonitril.

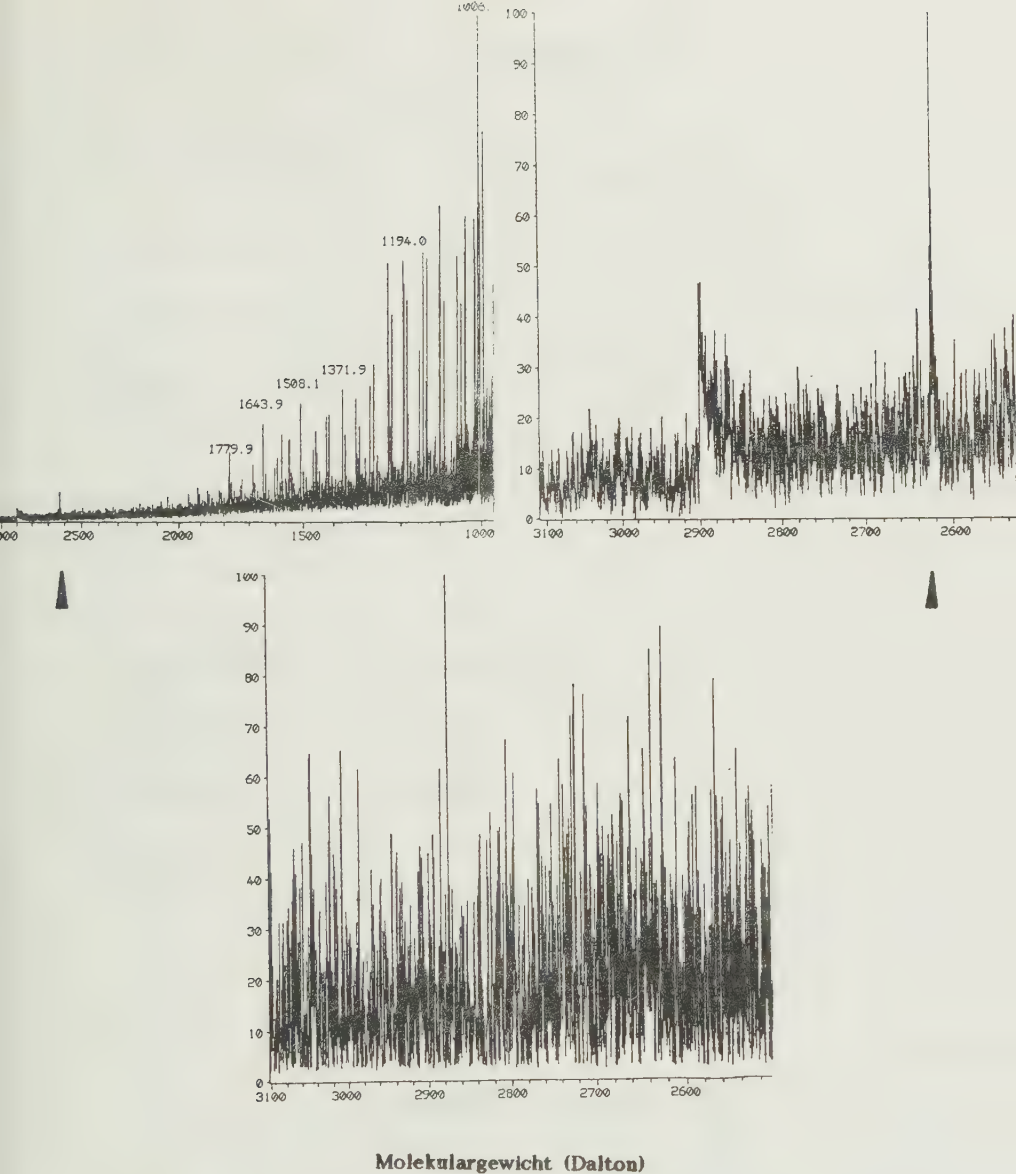
In der einzigen aktiven Fraktion 45-24 erscheint nach 59 Minuten - das entspricht 35% Acetonitril - ein deutlicher Peak sowohl bei 280nm als auch bei 214nm, der in den anderen untersuchten Fraktionen fehlt (Pfeil).

Dieser Peak wurde als eine von zehn Fraktionen als HPLC-Fraktion 45-24.5 (51.-67. Minute) aufgefangen. Durch schrittweises Einengen in der Speedvac und Wiederauffüllen mit Bidest und Injektionspuffer wurden Acetonitril und TFA abgedampft und durch Injektion die Wirkung auf die Mitose getestet. Es zeigte sich eine verringerte, aber signifikante Beschleunigung der Mitose um 17 Minuten. Demzufolge könnte es sich bei der Substanz, die den deutlichen Peak bei 35% Acetonitril verursacht, um die gesuchte mitosebeschleunigende Komponente des Extraktes handeln. Der Rest der Probe 45-24.5 wurde zur Trockne eingengt und mit FAB (Fast-atomic-bombardment Massenspektrometrie) weiter untersucht.

### 3.16. FAB (Fast-atomic-bombardment Massenspektrometrie)

Per FAB-Massenspektrometrie ist es möglich, das Molekulargewicht reiner Substanzen sehr genau zu bestimmen. Im Falle von Peptiden kann man zusätzlich aus der Grösse der Bruchstücke unter Umständen die Sequenz ableiten. Die FAB wurde durchgeführt, um das Molekulargewicht der gesuchten Substanz zu bestimmen.

Die trockene HPLC-Fraktion 45-24.5 wurde mit 20µl DMSO aufgenommen. Je 2µl wurden pro FAB-Messung verbraucht. In Testläufen erwies sich 3-NBA (3-Nitrobenzylalkohol) als die am besten geeignete Matrix, hier gab es die geringsten Siede- und Verpuffungseffekte. Aufgrund der geringen Menge waren die Signale vergleichsweise schwach (Abbildung 19).



**Abbildung 19.**  
**Spektren des FAB von HPLC-Fraktion 45-24.5.** Oben: Messung bei  
geringerer Auflösung (rechts: vergrößerte Darstellung). Unten:  
Messung bei höherer Auflösung.

Es zeigte sich ein möglicher Molenpeak bei 2625 Da (Abbildung 19 oben). Bei einer nachfolgenden Messung bei höherer Auflösung konnte dieser Befund nicht reproduziert werden (Abbildung 19 unten).

#### 4.1. Bei der aktiven Substanz handelt es sich wahrscheinlich um ein Protein

Die desaktivierende Wirkung von Proteinase K, nicht jedoch von RNase und Phosphatase deutet auf ein Protein als wirksame Substanz hin. Auch die Absorbanz bei 214nm (Peptidbindung) als auch 280nm (aromatische Aminosäuren) unterstützt diese Hypothese. Die auffallende Labilität gegenüber Einfrieren ist für Peptide ungewöhnlich, wenngleich es Beispiele für solche Instabilitäten gibt (siehe Abschnitt 4.2). Für andere Substanzklassen wie Oligonuklotide, zyklische Nukleotide, Steroide, Zucker, Lipide - bis auf Oligonukleotide kommen diese Gruppen vom Molekulargewicht ohnehin kaum in Frage - wäre eine derartige Instabilität gegenüber Einfrieren allerdings als noch ungewöhnlicher einzustufen als für Proteine.

Um die Beteiligung kleiner Proteine an den Mechanismen molekularbiologischer Regulation darzustellen, sei an dieser Stelle ein Ausschnitt aus der Vielfalt biologisch aktiver Peptide mit geringem Molekulargewicht gezeigt (Tabelle 2).

Tabelle 2

| <u>Biologisch aktive Peptide</u> |                |            |                 |
|----------------------------------|----------------|------------|-----------------|
| <u>Bezeichnung</u>               | <u>MW (AS)</u> | <u>(D)</u> | <u>Struktur</u> |
| <b>Antibiotika</b>               |                |            |                 |
| Alamethicin                      | 20             |            |                 |
| Emerimicin                       | 15             |            |                 |
| Gramicidin                       |                | 1141       | zyklisch        |
| Mycobacillin                     | 13             | 1528       | zyklisch        |
| Subtilin                         | 32             |            |                 |
| Telomycin                        | 10             | 1272       | zyklisch        |
| Tyrocidine                       | 10             |            |                 |
| Valinomycin                      | 12             | 1111       | zyklisch        |

## Fortsetzung Tabelle 2

### Hormone und vasoaktive Peptide

|                        |         |      |       |
|------------------------|---------|------|-------|
| ACTH                   |         | 4567 |       |
| Cargutocin             | 7       | 916  |       |
| Ceruletide             | 10      |      |       |
| Endothelin             | 21      |      | 2 S-S |
| Gastrin                | 17 (34) |      |       |
| Giractide              | 18      | 2219 |       |
| Glucagon               | 29      | 3550 |       |
| Felypressin            |         | 1040 | 1 S-S |
| Insulin                | 51      | 6000 | 2 S-S |
| $\alpha$ -Melanotropin | 18-22   |      |       |
| Motilin                | 22      |      |       |
| Secretin               | 27      |      |       |
| Somatomedins           |         | 7500 |       |
| Somatostatin           | 14      | 1638 | 1 S-S |
| Terlipressin           | 12      | 1227 | 1 S-S |
| Vasopressin            | 9       |      | 1 S-S |

### Neurologisch aktive Peptide

|                    |    |      |  |
|--------------------|----|------|--|
| Bombesin           | 14 | 1620 |  |
| $\beta$ -Endorphin | 30 |      |  |
| Neurotensin        | 13 |      |  |
| Scotophobin        | 15 | 1581 |  |
| Substance P        | 11 | 1348 |  |

### Proteaseinhibitoren

|                   |    |             |       |
|-------------------|----|-------------|-------|
| Acrosininhibitor  |    | 5600        |       |
| Aprotinin         | 58 |             | 3 S-S |
| 2-Carnosinaseinh. |    | $\leq 2000$ |       |
| Hefeinhibitor 1a  |    | 7700        |       |
| Hefeinhibitor 1b  |    | 8500        |       |
| Hefeinhibitor 1c  |    | 2500        |       |
| Leupeptin         | 4  |             |       |
| Pepstatin A       | 6  |             |       |

### Wachstumsfaktoren

|              |       |       |  |
|--------------|-------|-------|--|
| CSF          |       | 25000 |  |
| ECBF         |       | 17000 |  |
| EGF          | 53 AS |       |  |
| IL1          | 271   |       |  |
| IL2          | 133   |       |  |
| IL3          | 133   |       |  |
| Interferon   | 146   |       |  |
| NGF          |       | 26000 |  |
| PDGF         |       | 30000 |  |
| TGF $\alpha$ |       | 7500  |  |
| TNF          | 157   |       |  |

Tabelle biologisch aktiver Peptide und ihres Molekulargewichts  
 Als Bezeichnung wurden die englischen Namen angegeben. Das  
 Molekulargewicht wird als Anzahl der Aminosäuren bzw. in Dalton  
 angegeben, Strukturmerkmale sind weitgehend vermerkt.

#### 4.2. Stabilität des Extraktes

Sehr grosse praktische Schwierigkeiten bereitete die Labilität der Aktivität gegenüber Einfrieren. Diese Labilität beschränkt sich allerdings auf den Extrakt, denn das Einfrieren des gesamten Plasmodiums in Stickstoff hat keine desaktivierende Wirkung. Im Falle eines Peptids wäre diese Labilität ungewöhnlich. Im allgemeinen kann man auf Proteine als Faustregel den Satz: "je kleiner, desto stabiler" anwenden [KLIBANOV & AHERN 1987]. Proteine mit 20 bis 30 Aminosäuren können jedoch eine Sekundärstruktur ausbilden:

- So bildet das Monomer (26 AS) von Mellitin (Tetramer) eine  $\alpha$ -Helix mit einer polaren und einer apolaren Seite [BALDWIN & EISENBERG 1987].
- Endothelin ist ein stark vasokonstriktorisches wirksames Peptid des Molekulargewichts 2492 Da mit 2 intramolekularen Disulfidbrücken [YANAGISAWA et al 1988].
- Substanz P, ein neurologisch aktives, lineares Peptid ohne S-S-Brücken von 1348 Da verliert seine Aktivität in höherer Konzentration oder bei pH grösser als 8.0 innerhalb weniger Minuten [PORTER & O'CONNOR 1982].
- Der schnelle Aktivitätsverlust von Secretin, einem Peptidhormon mit 27 Aminosäuren konnte zum Teil auf eine  $\alpha \rightarrow \beta$ -Isomerisierung des Asparagins zurückgeführt werden [BEYERMANN et al 1981].

Die Thermodynamik der Denaturierung gilt also im Prinzip auch für kleine Proteine: die höhere Entropie infolge des 'Versteckens' hydrophober Domänen nimmt mit der Temperatur ab, was zu einer irreversiblen Exposition hydrophober Aminosäuren führen kann [TABORSKY 1979]. Während des Gefrierens bilden sich schrumpfende flüssige Kavitäten, in denen sich Ionenstärke und pH innerhalb

weiter Grenzen ändern können. Auch die Neuformation von intra- oder intermolekularen Disulfidbrücken durch Oxidation, die durch Entfaltung und Aufkonzentration während des Gefrierens begünstigt wird, ist denkbar [TABORSKY 1979], ebenso, wie die Trennung oligomerer Bestandteile. Gelegentlich kann man einen oder mehrere dieser Effekte durch geeignete gefrierschützende Massnahmen wie der Zugabe von Glycerol, DMSO, Sucrose, DTT oder schockartiges Einfrieren vermeiden. In jedem Fall ist aber ein auf den speziellen Fall abgestimmtes, empirisches Rezept notwendig: so ist der Aktivitätsverlust von Katalase beim Einfrieren mit Polyvinylpyrrolidon (PVP) und Glycerol grösser als mit PVP allein, während PVP, Glycerol und Sucrose den geringsten Aktivitätsverlust zur Folge haben [FISHBEIN & WINKERT 1979]; geringe Konzentrationen von DMSO verstärken den Aktivitätsverlust von Invertase, während höhere Konzentrationen ihn vermindern [TONG & PINCOCK 1969]. Grundsätzlich ist schnelles Gefrieren günstiger [SCOPES 1982]. Die Erhaltung der Aktivität im ganzen Plasmodium beruht möglicherweise auf einer 'gefrierschützenden' Umgebung im zellulären Milieu. Zum anderen wird durch das sehr grosse Verhältnis Oberfläche zu Volumen des flachen Plasmodiums ein extrem schnelles Einfrieren und Auftauen ermöglicht.

#### 4.3. Andere Ansätze der Suche nach einem Aktivator der Mitose bei *Physarum*

Vier frühere Ansätze zur Auffindung eines mitosestimulierenden Faktors bei *Physarum* sind veröffentlicht.

- BREWER sowie OPPENHEIM & KATZIR applizierten lyophilisierte Plasmodien aus späten Phasen auf die Oberfläche von 'frühen' Plasmodien [BREWER 1968, OPPENHEIM &

KATZIR 1971]. Bei beiden fand sich die deutlichste Beschleunigung der Mitose des Akzeptorplasmodiums, wenn der Donor sich drei Stunden vor der Mitose befand. Diese Methode könnte ähnlich wie die Injektionsmethode benutzt werden, die Phase von Akzeptorplasmodium und Donorplasmodium zu variieren; es könnten Phasenresponsekurven erstellt werden. Ein solcher Versuch ist bislang nicht unternommen worden.

- BLESSING und LEMPP reinigten Zellextrakte aus zwei Zellzyklusphasen mithilfe polyklonaler S-Phaseantikörper vor und applizierten diese in flüssiger Form auf die Oberfläche 'früher' Plasmodien. In der späten G2-Phase, kurz vor dem Beginn der Prophase beschreiben sie eine Aktivität, die die Mitose des Akzeptorplasmodiums um 35 Minuten beschleunigt. Kurz nach der Mitose des Donorplasmodiums ist diese Aktivität verschwunden [BLESSING & LEMPP 1978]. Diese Arbeit stimmt im Ergebnis mit den eigenen Ergebnissen überein. Problematisch erscheint die von ihnen verwendete Methode, den Extrakt direkt auf die Plasmodienoberfläche zu tropfeln. Mehreren Veröffentlichungen und eigenen Beobachtungen zufolge führt das zu einer Zerstörung der Plasmodienoberfläche [z.B. OPPENHEIM & KATZIR 1971, UEDA & VON OLENHUSEN 1978], wenngleich man den unterschiedlichen Einfluss verschiedener Puffer nicht ausschliessen kann.

- LOIDL und GRÖBNER fanden das Maximum der Beschleunigung bei M-90, also anderthalb Stunden vor der Mitose des Donors [LOIDL & GRÖBNER 1982, LOIDL & GRÖBNER 1985]. Sie applizierten die Extrakte während eines kurzen

Zeitraums bei der Startfusion der Mikroplasmodien und untersuchten die Verschiebung der ersten Mitose. Der Nachteil ihrer Methode ist, dass der Extrakt nicht zu verschiedenen Zeitpunkten des Zyklus appliziert und daher keine Phasenresponsekurve des Akzeptors erstellt werden kann, ausserdem ist die Synchronie bei der ersten Mitose noch sehr gering.

Entgegen den ausdrücklichen Absichtserklärungen in den Veröffentlichungen wurde offenbar keiner dieser vielversprechenden Ansätze weiter verfolgt, möglicherweise in Ermangelung eines wirklich geeigneten Testsystems, das es gestattet, eine Vielzahl von Proben zu unterschiedlichen Zellzykluszeiten zu applizieren und schnell auf eine Wirkung zu testen. In keinem der genannten Ansätze gelang es, die mitosebeschleunigende Aktivität in Bezug auf ihr Molekulargewicht näher zu charakterisieren, noch konnte sie mit einem gleichzeitigen analytischen Pendant, etwa einem Elektrophorese- oder HPLC-Peak, korreliert werden.

In fünf Ansätzen wurden somit drei verschiedene Zeitpunkte im Zellzyklus von *Physarum* ermittelt, bei denen ein Maximum an beschleunigender Aktivität erscheint: drei Stunden vor der Mitose [BREWER 1968, OPPENHEIM & KATZIR 1971], anderthalb Stunden vor der Mitose [LOIDL & GRÖBNER 1982], eine halbe bis eine dreiviertel Stunde vor der Mitose, beim Übergang G2/M-Phase [BLESSING & LEMPP 1978, eigene Untersuchungen]. Diese Befunde müssen sich nicht widersprechen. So könnte der von LOIDL gefundene Zeitpunkt mehr eine vorbereitende Funktion haben, bei dem (reversible) Aktivitäten des Zellzyklus beginnen, die im "Determinationspunkt" G2/M (siehe Abschnitt 4.5.) kulminieren und dort die Teilung irreversibel starten. Beispielsweise beginnt die Synthese von  $\alpha$ -Tubulin-mRNA in der mittleren G2-Phase, die hauptsächlich zur

Ausbildung des Spindelapparates während der Mitose dient [LAFFLER & TYSON 1986]. Der Beginn der Transkription von Histongenen und der Akkumulation von Histon-mRNA beginnt in der frühen G2-Phase, die Histon-Proteinsynthese beginnt in der frühen S-Phase. Auch die Verdoppelung des Tubulinsynthesepeaks und der Thymidinkinaseaktivierung nach Hitzeschock - ein Peak erscheint im normalen, ungestörten Zeitraster, ein Peak vor der verzögerten Mitose - wurde im Sinne eines Grössenkontrollpunktes während der mittleren G2-Phase diskutiert [LAFFLER & TYSON 1986].

Die Ursache für die unterschiedlichen Befunde lässt sich durch die verschiedenen Präparations- und Testmethoden erklären.

#### 4.4. Ein Kontrollpunkt im Zellzyklus beim Übergang G2/M

##### 4.4.1. Die Determination zur Mitose bei *Physarum*

Die Determination der Kerne zur Mitose findet sehr spät im Zellzyklus von *Physarum* statt. Durch UV wurde eine mit dem Fortschreiten des Zyklus abnehmende Verzögerung der Mitose erreicht. Die Extrapolation dieser abnehmenden Kurve ergab einen Punkt 50 Minuten vor der Metaphase, an dem keine Verzögerung durch UV mehr verursacht wird [MATSUMOTO 1977].

Die Fusionsexperimente von LOIDL zeigen, dass sich die Mitose der älteren Kerne noch verzögern lässt, wenn die Fusion bis 30 Minuten vor der Prophase stattfindet. Das entspricht dem Zeitpunkt M-55. Bei Fusion 10 Minuten vor der Prophase, also etwa M-35, durchlaufen die älteren Kerne wie ungestört ihr Programm [LOIDL & SACHSENMAIER 1982]. Fast den gleichen Determinationszeitpunkt zeigten die phasenspezifischen Hemmungen mit Cycloheximid (CHX). CHX-Pulse konnten die Mitose nur verzögern, wenn sie bis 30 Minuten vor der Metaphase [SCHEFFEY 1978] bzw. 10-20

Minuten vor der Metaphase [HERDUGO & TYSON 1984] gegeben wurden, also bis M-40 bzw. M-(20-30). Berücksichtigt man für die Fusionsexperimente eine Fusionsdauer von fast 30 Minuten, so muss man die Teilungsdetermination kurz vor oder mit den ersten sichtbaren Anzeichen der Prophase vermuten. Die Mitose lässt sich in gewissem Ausmass von der S-Phase entkoppeln. Nach den sehr späten CHX-Pulsen (10-20min vor Metaphase) fand sich ein bestimmter Anteil polyploider Kerne, d.h. trotz unterbliebener Teilung kam es zu einer DNA-Synthese [HERDUGO & TYSON 1984]. Auch Hitzepulse während der frühen Prophase konnten die Teilung eines gewissen Prozentsatzes der Kerne verhindern, nicht aber deren DNA-Synthese [BREWER & RUSCH 1968]. Der Determinationspunkt zur Mitose liegt in diesem Fall während der Metaphase [WOLF et al 1979]. Möglicherweise wird der Ablauf der DNA-Synthese also etwas früher irreversibel festgelegt als der Ablauf der Kernteilung. Oder der Prozess der Teilung enthält Elemente, die auf Hitze und CHX 'empfindlicher' reagieren als die DNA-Replikation.

Der Determinationspunkt in Bezug auf einen hypothetischen Aktivator ist also von einem Determinationspunkt in Bezug auf Hitze und CHX zu unterscheiden, da Störpulse Nebenwirkungen haben, die bei einer Fusion nicht auftreten. Zusammenfassend kann man sagen, dass die Fusionsexperimente einen Determinationspunkt für einen hypothetischen Aktivator anzeigen, der etwa 30-40 Minuten vor der Teilung liegt. Diesem Punkt geht das Auftauchen der in dieser Arbeit gefundenen Substanz unmittelbar voraus. Sollte diese Substanz Bestandteil einer Zellzyklusuhr von *Physarum* sein, so handelt es sich entweder um einen der letzten Schritte, der bei der Mitose eine Rolle spielt, oder einen der frühen, ersten Schritte des neuen Zyklus, der dann möglicherweise bei der DNA-Replikation eine Rolle spielt.

#### 4.4.2. Weitere Veränderungen am mitotischen Kontrollpunkt bei *Physarum*

Weitere biochemische Parameter zeigen ebenfalls etwa zum Zeitpunkt des Auftauchens der mitosebeschleunigenden Aktivität deutliche Änderungen im Zellzyklus von *Physarum* (Tabelle 1). Man findet hier ein Maximum des cAMP-Gehalts [LOVELY & THRELFALL 1976], der Aktivität von Proteinkinasen [SHIBAYAMA et al 1983], der Tubulinsynthese [LAFFLER 1986]. Die Reaktion eines polyklonalen Antikörpers gegen MYC zeigt ein Maximum während der späten G2-Phase und verschwindet bis zur Metaphase [SAUER et al 1986]. Mitotische Extrakte aus *Physarum* wurden *Xenopus*-Oozyten injiziert und führten ebenso wie MPF zum Abbau des germinalen Vesikels. Diese Aktivität fand sich ausschliesslich in der späten G2 und M-Phase, nicht aber in postmitotischen und frühen G2-Extrakten. Extrakte 45 Minuten nach der Mitose inhibierten diese Aktivität [ADLAKHA et al 1988].

#### 4.4.3. Kontrollpunkte des Zellzyklus bei anderen Organismen

Der wichtige Zellzykluskontrollpunkt am G2/M-Übergang stimmt überein mit dem bei *S.pombe*, *Xenopus* und anderen Organismen gefundenen Kontrollpunkt des Zellzyklus. Die unabhängig voneinander bei *S.pombe*, *Xenopus*, Muscheln sowie Säugerzellkulturen gefundenen Proteine CDC2, MPF und Cyclin-A/B, die offensichtlich essentielle Bestandteile der Zellzyklusuhr darstellen (und möglicherweise analog wirkende oder homologe Proteine sind) entfalten ebenfalls am G2/M-Übergang maximale Aktivität. Ein weiterer Kontrollpunkt des Zellzyklus bei z.B. *S.pombe*, *S.cerevisiae*, Säugerzellen in Zellkultur liegt in der G1-Phase, bei dem vor der S-Phase auf Grösse und Nährstoffverfügbarkeit kontrolliert wird. Er kommt zum Vergleich mit der Situation bei *Physarum* nicht in Frage oder ist identisch mit dem G2/M-Punkt.

#### 4.5. Aktivierung der mitosebeschleunigenden Substanz

Das plötzliche Auftauchen der mitosebeschleunigenden Aktivität etwa 50-60 Minuten vor der Kernteilung und das Verschwinden etwa 25-35 Minuten vor der Kernteilung kann am besten durch eine Neusynthese oder proteolytische Aktivierung und Degradation erklärt werden. Eine Parallele im Bereich des Zellzyklus sind Cycline, die während des Meta/Anaphasewechsels abrupt und selektiv degradiert werden [DRAETTA et al 1989]. Untersuchungen an Mutanten von M-Faktoren bei HeLa-Zellen - M-Faktoren entsprechen in Phase und Wirkung MPF - deuten darauf hin, dass die mRNA dieser mitotischen Induktoren während der S-Phase transkribiert wird, aber erst in der G2-M-Phase schnell translatiert wird [KAI et al 1986].

Andere Erklärungsmöglichkeiten sind ebenfalls denkbar. Somatomedine beispielsweise zirkulieren im Blut in höheren Konzentrationen, sind jedoch an einen höhermolekularen Trägerprotein gebunden und werden bei Bedarf freigesetzt.

#### 4.6. Eine mögliche Wirkung der mitosebeschleunigenden Substanz auf die DNA-Replikation

Die S-Phase in Plasmodien von *Physarum* hat eine relativ konstante Dauer. Sie liegt bei etwa drei Stunden [z.B. Braun et al 1965, BRAUN & WILI 1969, HALL & TURNOCK 1976, FUNDERUD et al 1978]. Der Vergleich eines farblosen Stammes (Periodenlänge 13 bis 16.5 Stunden bei 25 Grad) mit dem Stamm M3C (Periodenlänge 9-11 Stunden bei 25 Grad) in Bezug auf den Einbau von  $^3\text{H}$ -Thymidin zeigte für beide Stämme eine gleiche Dauer der S-Phase [KAUFFMAN & SHYMKO 1982].

Die Injektion der aktiven Substanz verursacht eine maximale

Verkürzung des Zellzyklus, wenn sie früh (etwa innerhalb der ersten 0-20% des Zellzyklus) im Zyklus erfolgt. Tendenziell nimmt die Wirkung der Injektion ab, je später sie erfolgt (Abbildung 4). Die Wirkung in schnellwachsenden Plasmodien scheint auszubleiben, wenn die Injektion nicht innerhalb der ersten 180 Minuten, d.h. innerhalb der S-Phase erfolgt. Durch späte Injektion (nach Ablauf von 45% des Zellzyklus) in ein langsamer wachsendes Plasmodium konnte gezeigt werden, dass auch eine Injektion ausserhalb der S-Phase eine Wirkung hervorrufen kann (Abschnitt 3.6.). Diese Injektion verursachte eine deutliche Beschleunigung der Mitose. Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmodien hatten eine Zellzyklusdauer von 7-9 Stunden. Diese Zeitdauer liegt an der unteren Grenze der in der Literatur beschriebenen Periodenlängen und könnte bereits die minimale Zellzykluslänge darstellen. Eine weitere Verkürzung durch Injektion kann dann nur noch gering ausfallen. Möglicherweise ist die Verteilung und/oder Wirkung der injizierten Substanz ein langsamer Prozess. Die injizierten Adern sind noch ein bis drei Stunden erkennbar, sie werden also nur langsam integriert. Die Wirkung würde dann von der Länge des Intervalls 'Injektion-nachfolgende Mitose' bestimmt. Die verringerte Wirkung später Injektionen wäre so plausibel erklärbar; das Ausbleiben der Wirkung gerade an der S/G2-Grenze schnellwachsender Plasmodien wäre dann Zufall.

Gleichwohl ist eine Wirkung der aktiven Substanz auf die DNA-Replikation nicht ganz auszuschliessen. FUNDERUD et al fanden mithilfe einer DNA-Zentrifugation im Sucrosegredienten, dass die Länge der DNA-Fragmente auch noch nach den ersten drei Stunden des Zyklus zunimmt. Sie führten das auf eine länger andauernde Ligation von 'Replikons' zurück, die möglicherweise sogar während

eines grösseren Teils der G2-Phase anhält [FUNDERUD et al 1978]. Die Synthese mitochondrialer DNA und der nukleolären Satelliten-DNA, die hauptsächlich für rRNA codiert, erfolgt während der S und der G2-Phase [ZELLWEGER et al 1972].

Die Beschleunigung des Mitosezyklus könnte also auch indirekt über die Beschleunigung der DNA-Replikation geschehen, etwa über eine aktivierende Wirkung auf die DNA-Ligation oder rDNA-Synthese.

#### 4.7. Eine mögliche Wirkung der mitosebeschleunigenden Substanz auf die Mitose

##### 4.7.1. Die Hypothese eines instabilen mitotischen Aktivators im Vergleich zur Wirkung von verschiedenen Störpulsen sowie Fusionsexperimenten

Die Befunde passen sehr gut zum Modell des instabilen Aktivators [WHEALS & SILVERMAN 1982]. Im Anschluss an die S-Phase beginnt hiernach die kontinuierliche Synthese eines hypothetischen instabilen Mitoseaktivators, der bei einer Schwellenkonzentration die Mitose einleitet. Statt einer Konzentrationsschwelle wurde auch die "Titration" eines Kernoberflächenäquivalents durch den Aktivator vorgeschlagen. Hiernach wächst die Anzahl der Aktivatormoleküle proportional zum Gesamtprotein, d.h. die Konzentration bleibt konstant. Der Aktivator bindet an hypothetische Bindungsstellen des Kerns, deren Anzahl nach TYSON und SACHSENMAIER proportional zur DNA-Menge ist. Dem widerspricht der Befund, dass Kerne mixoploider Stämme sich mit gleicher Synchronie teilen wie die von haploiden oder diploiden Stämmen [KUBBIES et al 1986]. Alternativ kann man sich vorstellen, dass die Anzahl der Bindungsstellen proportional zur Kernoberfläche

Bindungsstellen besetzt sind, steigt die Aktivatorkonzentration auf einen Schwellenwert und leitet die Mitose ein [TYSON & SACHSENMAIER 1978,1985, TYSON 1987].

Eine Grössenkontrolle ist diesem Modell inhärent, sie besteht in der 'Messung' der Anzahl der freien Kernoberflächenäquivalente durch die fortlaufende 'Titration' des Aktivators.

Hitzeschocks würden die Kernbindungsstellen wieder freimachen - das erklärt die zur Mitose hin immer stärker werdende Wirkung von Hitzeschocks. Durch Proteinsyntheseinhibitoren würde die Mitose verzögert, da die Synthese des Aktivators ruht bei gleichbleibender Degradation, eine Voraussage, die durch frühere Untersuchungen bestätigt ist [z.B. SCHEFFEY 1978, TYSON et al 1979]. Der umgekehrte Fall, die Beschleunigung der Mitose infolge des Einwirkens von Proteasehemmern - die Degradation wird gehemmt bei gleichbleibender Synthese - wird in der vorliegenden Arbeit bestätigt (Abschnitt 3.12.). Das plötzliche Auftauchen der mitosebeschleunigenden Substanz zu einem Zeitpunkt, der mit dem irreversiblen Determinationspunkt zur Mitose übereinstimmt, könnte der Absättigung der Kernbindungsstellen und einer für kurze Zeit überschüssenden Synthese entsprechen. Der Abfall der Aktivität nach 10-20 Minuten könnte durch eine spezifische Proteolyse oder durch die Verdoppelung der Kernbindungsstellen vor der S-Phase bewirkt werden.

Die Injektion des Extrakts würde die Konzentration des Aktivators erhöhen und den Zellzyklus verkürzen. Die Injektion von Extrakten aus anderen Phasen hätte keine Wirkung, weil sich die Konzentration nicht ändert. Ein Hitzepuls nach Injektion während der Interphase würde Degradation und Synthese gleichermaßen betreffen, die Wirkung der Injektion wäre nicht berührt. Das entspricht dem Befund (Abschnitt 3.7.2). Ein Hitzepuls am G2/M-

Übergang würde die überproportionale Synthese überproportional betreffen, die Wirkung eines solchen Extrakts müsste reduziert sein. Auch das entspricht dem Befund (Abschnitt 3.7.1).

Eine ähnliche "Titration" eines mitotischen Aktivators wird für das System CDC25/CDC2 [FIGGE & SMITH 1988], weel/cdc25 [TYSON 1987] sowie Cyclin-A/B/MPF diskutiert [DRAETTA et al 1989].

Durch Fusion eines 'jungen' Plasmodiums kurz nach der Mitose mit einem 'älteren' Plasmodium konnte gezeigt werden, dass die resultierende Mitose sich zwischen den Kontrollen befindet, d.h. die Kerne des 'jüngeren' Plasmodiums wurden zu einer verfrühten Mitose, die 'älteren' Kerne zu einer verzögerten Mitose gebracht [RUSCH et al 1966, CHIN et al 1972, SACHSENMAIER et al 1972, LOIDL & SACHSENMAIER 1982]. Bei der Fusion werden Kerne und Cytosol, d.h. im Sinne der Hypothese gebundener und freier Aktivator vermennt und ihre Konzentrationen angeglichen. Die 'älteren' Kerne würden also einen Teil des Aktivators verlieren, den die 'jüngeren' Kerne dann aufnehmen könnten. Im Gegensatz dazu würde bei der Injektion zellulärer Extrakte ausschliesslich freier Aktivator transportiert. Dessen Konzentration ist zu allen Zeiten des Donorplasmodiums konstant und hat keinen Effekt auf die Mitose des Akzeptorplasmodiums, ausgenommen kurz vor der Mitose.

#### 4.7.2. Proteolytisches Spaltprodukt

Es könnte sich bei der gefundenen Substanz um einen Proteasehemmstoff handeln. Für die Aktivierung und Inaktivierung von Proteinen durch Proteolyse seien an dieser Stelle einige Beispiele genannt:

- Die Hefe-Chitinsynthese liegt zunächst in einer inaktiven Form vor, die proteolytisch durch Proteinase B

- aktiviert werden kann [HOLZER 1979].
- Phosphorylase-B-Kinase ist proteolytisch aktivierbar durch eine Calcium-aktivierte, nichlysosomale Protease [HOLZER 1979].
  - NPF (neurite promoting factor, 43kDa) ist ein Proteaseinhibitor, der in Gliazellen gefunden wurde und die proteolytische Aktivität moduliert, die mit neuronalen Zellen assoziiert ist. NPF inhibiert oder fördert das Auswachsen von Neuriten [GUENTHER et al 1985].
  - Calpain II, eine durch Calcium aktivierte Protease, befindet sich während der Interphase hauptsächlich auf der Plasmamembran des Zellkerns, während der Prophase findet es sich assoziiert mit Chromosomen. Die Mikroinjektion von Calpain II in PtK1-Zellen beschleunigte den Beginn der Metaphase [SCHOLLMAYER 1988].
  - Nucleolin, ein in grösseren Mengen vorkommendes Kernprotein (713 AS) inhibiert die Transskription, bis es nach Phosphorylierung proteolytisch gespalten wird [BOUCHE et al 1988].
  - PCNA/Cyclin, das Hilfsprotein der DNA-Polymerase  $\delta$ , wird proteolytisch inaktiviert [BRAVO & CELIS 1980].
  - Die Cycline A/B von *Spisula* werden während der Interphase kontinuierlich synthetisiert und während der Mitose degradiert [DRAETTA et al 1989].
  - Multifunktionale Proteinkinasen wie die Ca/Calmodulin-abhängige Kinase (CaM-Kinase), MLCK (myosin light chain kinase), cGMP-, cAMP-abhängige Proteinkinase, PKC enthalten eine inhibitorische Domäne, die nach Wechselwirkung mit dem entsprechenden second messenger "wegklappen". Die proteolytische Entfernung dieser Do-

mäne führt ebenfalls zur Aktivierung der Kinasen [SCHULLMAN & LOU 1989].

- Dividin ist ein 54 kDa Kernphosphoprotein transformierter und normaler menschlicher Zellkulturzellen, das wie PCNA ausschliesslich während der S-Phase wachsender Zellen vorkommt und proteolytisch inaktiviert wird [CELIS & NIELSEN 1986].

Die in dieser Arbeit gefundene mitosebeschleunigende Substanz könnte das Produkt der proteolytischen Spaltung eines Cyclin-Analogons darstellen. Das injizierte Spaltprodukt könnte zu anderen Zeiten mit dem Abbau des Cyclin-A/B-Analogons 'kompetieren' und dadurch den Zyklus verkürzen. So konnte durch ein 16 Aminosäuren langes Peptid, das aus CDC2 stammt und zunächst zur Gewinnung eines Antikörpers gegen CDC2 synthetisiert worden war, eine Beschleunigung des Abbaus der Kernmembran und Chromatinkondensation induziert werden [GAUTIER et al 1988]. Auch die Aktivität von MPF wird möglicherweise über die Assoziation mit einem intakten Cyclin-A/B reguliert: die Mikroinjektion von Proteaseinhibitoren kurz vor der meiotischen Teilung von Muscheloozyten arretiert die Zellen in der Metaphase und stabilisiert die Kinaseaktivität von MPF [PICARD et al 1985]. Die Wirkung der Injektion von Proteaseinhibitoren und einer Protease passt gut in dieses Schema (Abschnitt 3.6.). Proteaseinhibitoren würden den Abbau des Cyclin-A/B-Analogons verlangsamen, Proteasen würden den Abbau beschleunigen.

#### 4.7.3. Autophosphorylierung

Das kurzfristige Auftreten der mitosebeschleunigenden Substanz zusammen mit der Wirkung zu anderen Zeiten des Zellzyklus könnte darauf hinweisen, dass es sich hier um ein Startsignal handelt,

das längerfristig andauernde Prozesse in Gang setzt. Diese Prozesse würden zu ihrem Anstoss lediglich einen einmaligen Puls benötigen, aber auch zu späteren Phasen für die Wirkung des Signals empfänglich sein.

Der Mitose geht in vielen Zellen ein Anstieg von Calcium voraus. Von vielen Kinasen ist die Möglichkeit der Autophosphorylierung bekannt. Für die CaM-Kinase ist nach einem Puls von Calcium ein starkes Ansteigen der Autophosphorylierung nachgewiesen, die ab einem bestimmten Grad der Phosphorylierung auch nach Calciumreduktion anhält. Diese autonome Autophosphorylierung ist ein intramolekularer Vorgang, sie findet innerhalb desselben Holoenzyms statt. Sie könnte lange fortschreiten; so wird die Involvierung dieser Autophosphorylierung in langfristige Prozesse wie der neuronalen Plastizität und des Gedächtnisses diskutiert [SCHULMAN & LOU 1989]. In diesen Zusammenhang gehört der Befund, dass viele zelluläre Proteine während der Mitose hyperphosphoryliert werden [z.B. GERACE & BLOBEL 1980, KARSENTI et al 1987]. In einer einfachen Analogie würde die mitosebeschleunigende Aktivität einen Prozess wie diese Autophosphorylierung starten. Die Injektion zu anderen Zeiten des Zellzyklus würde die Autophosphorylierung neusynthetisierter Kinasen starten. Vorbereitende Schritte zur Mitose könnten bei einem bestimmten Phosphorylierungsgrad beginnen, mit der dann eine Dephosphorylierung einhergeht. Für das *Spisula*-CDC2-Analog P34, dessen Phosphorylierungsgehalt während des Zellzyklus (im Gegensatz zu CDC2 bei Hefe) ansteigt, wird eine abschliessende Dephosphorylierung zur Mitose diskutiert [DRAETTA & BEACH 1988].

#### 4.8.      Ausblick

Der Flaschenhals für weitere Untersuchungen ist, wie in vielen ähnlichen Fällen, die Gewinnung und Reinigung einer ausreichenden Menge Substanz - die Gewinnung von Extrakten aus der kurzen Phase M3-40 bis M3-50 erfolgt zufällig und ist sehr zeitraubend.

In weiteren Experimenten sollte bewiesen werden, dass es sich bei der mitosebeschleunigenden Aktivität um ein Protein handelt. Eine erfolgreiche Sequenzierung ginge gleichzeitig einen Schritt weiter und würde den Vergleich mit in Datenbanken gespeicherten Sequenzen und so am direktesten Rückschlüsse auf die Funktion erlauben. Mithilfe fluoreszierender Antikörper könnte man den Wirkort innerhalb der Zelle bestimmen.

Eine weitere wichtige Anwendungsmöglichkeit der Injektionsmethode wäre die Applikation von cDNA zur Transformation mithilfe von Plasmiden.

### 5.1. Injektionsmethode

Das Hauptziel dieser Arbeit war es, aus zellulären Extrakten von *Physarum polycephalum* einen mitosestimulierenden Faktor zu isolieren. Hierzu war es in Ermangelung eines geeigneten biologischen Testverfahrens notwendig, einen solchen erst zu etablieren. Als Methode bietet sich die Mikroinjektion an, da die Makroplasmodien von *Physarum* überzogen sind mit einem Netz von Adern, in denen eine schnelle Strömung Cytoplasma und cytoplasmatische Bestandteile gleichmässig in der gesamten Zelle verteilt. Die Mikroinjektion bei *Physarum* wurde bislang entweder an hungernden Plasmodien durchgeführt, deren Adern sehr viel dicker und härter sind als die wachsender Plasmodien (HILDEBRANDT, pers.Mitt.), oder an koffeinbehandelten Miniplasmodien ohne plasmalemmales Invaginationssystem und ohne motorische Aktivität, sogenannten 'Caffein-droplets' [KUKULIES et al 1984]. In Experimenten zum Mechanismus des Kontraktionsrhythmus wurden injizierte Adern nur kurze Zeit nach der Injektion beobachtet [z.B. UEDA & VON OLENHUSEN 1978, KAMIYA et al 1982, AKITAYA et al 1984]. Die dabei verwendeten Injektionspuffer wurden getestet. Sie erwiesen sich nicht als optimal geeignet.

Eine Anwendung dieser Methode auf die Frage nach einem mitotischen Stimulator fand bislang nicht statt.

In dieser Arbeit wird ein geeigneter Injektionspuffer beschrieben und ein Zusammenhang zwischen Injizierbarkeit und optimalem Wachstum des Plasmodiums hergestellt. Die Injektionsmethode ermöglichte die Suche nach einem mitotischen Aktivator aus zellulären Extrakten, sie stellt darüber hinaus eine Möglichkeit dar,

weitere Hemmstoffe, z.B.auch solche, die nicht durch Membranen permeieren, zu injizieren und in ihrer phasenspezifischen Wirkung auf den Zellzyklus zu untersuchen.

Wegen des Auseinanderdriftens des Zellzyklus von geteilten Plasmodien sind parallele Injektionen und parallele Kontrollen notwendig. Die Daten sind in der Regel an geviertelten Plasmodien gewonnen worden, von denen zwei Viertel injiziert wurden und zwei Viertel als Kontrolle dienten; eine Substanz wurde zudem in mehrere Plasmodien injiziert. Dabei ist eine Phasendifferenz von 10 Minuten bereits signifikant (95%).

## 5.2. Injektion verschiedener Substanzen

Die Injektionsmethode wurde in ihrer Wirksamkeit exemplarisch durch die Injektion verschiedener Substanzen getestet. So führte RNase zum sofortigen Absterben des Plasmodiums. Durch die meisten der beispielhaft ausgesuchten Substanzen wurden unterschiedliche Verzögerungen der Mitose verursacht. Bei der Suche nach Komponenten des Zellzyklus galt das Augenmerk in dieser Arbeit jedoch insbesondere einer Beschleunigung der Mitose. Überraschend war der Befund, dass verschiedene Proteaseinhibitoren (PMSF, Aprotinin, Antipain, Leupeptin) den Zellzyklus signifikant beschleunigten.

## 5.3. Wachstumshemmende Wirkung des Extrakts

Angeregt durch eine zufällige Kontamination von Fibrinogenplatten konnte in einem qualitativen Test auf Wachstumshemmung mit definierten Stämmen zunächst eine Hemmung auf *S.albus* sowie *B.subtilis* festgestellt werden. Anhand eines quantitativen Tests,

bei dem mit stufenweise verdünnten Antibiotika verglichen wurde, wurde mit einem verdünnten Extrakt eine leichte Wachstumshemmung auf *B.subtilis*, nicht jedoch *E.coli* und *S.albus* beobachtet. Die Hemmung ist als geringfügig einzustufen.

#### 5.4. Asynchrone Variante

Eine im Verlauf der Untersuchungen aufgetauchte asynchrone Variante Cl-Mü-asy, deren Mitosesynchronie nicht bei  $\pm 2$  min, sondern bei  $\pm 19$  min lag, wurde mit dem Flowzytometer auf einen möglichen Wechsel des Ploidiegehalts untersucht. Dieser unterschied sich jedoch nicht vom Ploidiegehalt des Stammes Cl-1B9. Die Asynchronie fand sich auch nach Encystierung, revertierte jedoch während eines Sporulationsdurchganges. Es handelte sich wahrscheinlich um ein Alterungsphänomen; eine Mutation ist nicht auszuschliessen. Die Spherulen wurden für weitere Untersuchungen konserviert.

#### 5.5. Reinigung und Molekulargewichtsbestimmung der aktiven Substanz

Die Injektion zellulärer Extrakte zeigte eine zellzyklusbeschleunigende Aktivität, die etwa eine dreiviertel Stunde vor der späten Telophase während eines Zeitraums von etwa 10-20 Minuten auftaucht. Die Mitose des injizierten Plasmodienteils zeigt sich im Durchschnitt etwa eine halbe Stunde eher als im Kontrollplasmodium; betrachtet man die Injektionen vorfraktionierter Extrakte, so zeigte sich eine mittlere Beschleunigung von etwa einer dreiviertel Stunde. In einzelnen Fällen betrug die Beschleunigung bis zu 70 Minuten bei einer Periodenlänge des ungestörten Zyklus von 7-10 Stunden. Dieser Effekt ist sehr stark

in Anbetracht der Tatsache, dass sowohl bei der Extraktgewinnung als auch bei der Injektion eine Verdünnung stattfindet. Der Vergleich der Proteilmuster per SDS-Gelelektrophorese zeigte keine Unterschiede für verschiedene Zeiten des Zellzyklus. Ein Molekulargewicht kleiner als 4000 Da kann man aus der Vorfraktionierung mit NAP10 und Centriscart ableiten. Eine Bestätigung dieses Befundes und genauere Bestimmung erfolgte bei der Gelfiltration durch den Vergleich mit der Elution von Molekulargewichtsmarkern. Hierbei zeigte sich ein ungefähres Molekulargewicht von 2500 Da. Durch Fraktionierung per Gelfiltration konnte die Aktivität in einer von 88 Fraktionen identifiziert werden. In der anschließenden weiteren Verarbeitung per HPLC konnte die Aktivität mit einem einzelnen Peak korreliert werden, der bei anderen, nichtaktiven Extrakten fehlt. Die Fraktionierung per HPLC entspricht einer Aufreinigung bis zur weitgehend sauberen Substanz. Die Injektion dieses Peaks zeigte eine Restaktivität. Ein genauerer Test mit FAB (Fast-atomic-bombardment Massenspektrometrie) ergab einen einzigen, allerdings aufgrund der geringen Substanzmenge schwachen möglichen Molekülpeak unter 3000 Da, genauer bei 2625 Da. Die deaktivierende Wirkung von Proteinase K, nicht jedoch RNase und Phosphatase, die Instabilität sowie die Absorbanz bei 214nm und 280nm deuten auf ein Protein als wirksame Substanz hin.

## 5. LITERATUR

- ADLAKHA, R.C.; WRIGHT, D.A.; SAHASRABUDDHE, C.G.; DAVIS, F.M.; PRASHAD, N.; BIGO, H.; RAO, P.N.:  
*Partial purification and characterization of mitotic factors from HeLa-cells*  
 Exp. C. Res. 160, 471 (1985)
- ADLAKHA, R.C.; SHIPLEY, G.L.; ZHAO, J.; JONES, K.B., WRIGHT, D.A.; RAO, P.N.; SAUER, H.W.:  
*Amphibian oocyte maturation induced by extracts of Physarum polycephalum in mitosis*  
 J. C. Biol. 106, 1445 (1988)
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.:  
*Molecular biology of the cell*  
 (1983)
- AKITAYA, T.; HIROSE, T.; UEDA, T.; KOBATAKE, Y.:  
*Variation of intracellular cyclic AMP and cyclic GMP following chemical stimulation in relation to contractility in Physarum polycephalum*  
 J. Gen. Microbiol. 130, 549 (1984)
- AVES, S.J.; DURKACZ, B.W.; CARR, A.; NURSE, P.:  
*Cloning, sequencing and transscriptional control of the S. Pombe cdc10 'start' gene*  
 EMBO J. 4, 457 (1985)
- BARQUE, J.P.; LAGAYE, S.; BENDAYAN, M.; PUVION-DUTILLEUL, F.; DANON, F.; LARSEN, C.:  
*PSL, an S-phase related p55 nuclear antigen, associates transiently with chromatin*  
 Exp. Cell Res. 157, 8 (1985)
- BALDWIN, R.L. & EISENBERG, D.:  
*Protein stability*  
 in: Protein engineering, 127 (1987), ed. Liss, A.R.
- BEACH, D.; DURKACZ, B.W.; NURSE, P.:  
*Functionally homologous cell cycle control genes in budding and fission yeast*  
 Nature 300, 706 (1982)
- BENDER, W.:  
*Homeotic gene products as growth factors*  
 Cell 43, 559 (1985)
- BEYERMANN, H.; GROSMAN, M.I.; SCRATCHARD, T.; SOLOMON, T.E.; VOSKAMP, D.:  
*On the instability of secretin*  
 Life Sci. 29, 885 (1981)

BLESSING, J. & LEMPP, H.:

*An immunological approach to the isolation of factors with mitotic activity from the plasmodial stage of the myxomycete Physarum polycephalum*  
Exp. C. Res. 113,435 (1978)

BOCHNER, B.R.; LEE, P.C.; WILSON, S.W.; CUTLER, C.W.; AMES, B.N.:

*AppppA and related adenylated nucleotides are synthesized as a consequence of oxidative stress*  
Cell 37,225 (1984)

BOER, P.A.J.; CROSSLEY, R.E.; ROTHFIELD, L.I.:

*A division inhibitor and a topological specificity factor coded for by the minicell locus determine proper placement of the division septum in E.coli*  
Cell 56,641 (1989)

BOS, T.J.; TSUCHIE, H.; TJIAN, R.; VOGT, P.K.:

*v-jun encodes a nuclear protein with enhancer binding properties of AP-1*  
Cell 52,705 (1988)

BOUCHE, G.; CAIZERGUES-FERRER, M.; BUGLER, B.; AMALRIC, F.;

*Interrelation between the maturation of a 100 kD nucleoprotein and pre-rRNA synthesis in CHO cells*  
Nucl. Ac. Res. 12,3025 (1984)

BRADBURY, E.:

*Injection of histone phosphorylating enzyme to the surface of plasmodia in mid G2 advances mitosis*  
Eur. J. Biochem. 33,131 (1983)

BRADBURY, E.; INGLIS, R.J.; MATHEWS, H.R.; SARNER, N.:

*Phosphorylation of very lysine rich histone in Physarum polycephalum*  
Eur. J. Biochem. 33,131 (1973)

BRAUN, R.; MITTERMAYER, C.; RUSCH, H.P.:

*Sequential temporal replication of DNA in Physarum polycephalum*  
PNAS 53,924 (1965)

BRAUN, R.:

*A ribonuclease from Physarum polycephalum - biochemical properties and synthesis in the mitotic cycle*  
BBA 195,87 (1969)

BRAUN, R. & WILI, H.:

*Time sequence of DNA replication in Physarum*  
BBA 174,246 (1969)

BRAVO, R. & CELIS, J.E.:

*A search for differential polypeptide synthesis throughout the cell cycle of HeLa-cells*  
J. Cell. Biol. 84,795 (1980)

BRAVO, R.; FRANK, R.; BLUNDELL, P.A.; MACDONALD-BRAVO, H.:

*Cyclin/ PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase  $\delta$*   
NATURE 326,515 (1987)

BREEDEN, L. & NASMYTH, K.:

Similarity between cell-cycle genes of budding yeast and fission yeast and the notch-gene of *Drosophila*  
Nature 329,651 (1987)

BREWER,E.N.:

Isolation of a mitosis stimulating factor from the slime mold *Physarum polycephalum*  
Fed. Proc. 28,840 (1968)

BREWER,E.N. & RUSCH,H.P.:

Effect of elevated temperature shocks on mitosis and on the initiation of DNA replication in *Physarum polycephalum*  
Exp. Cell Res. 49,79 (1968)

BROOKS,R.F.; BENNETT,D.C.; SMITH,J.A.:

Mammalian cell cycles need two random transitions  
Cell 19,493 (1980)

BROOKS,R.F.:

in RENSING,L. & JAEGER,N.:  
*Temporal Order*  
(1985)

CARRINO,J.:

The effect of heatshock on the cell-cycle regulation of tubulin expression in *Physarum polycephalum*  
J. Cell Biol. 100,642 (1985)

CARRINO,J.J. & LAFFLER,T.G.:

Transcription of  $\alpha$ -tubulin and histone H4 genes begin at the same point in the cell cycle of *Physarum polycephalum*  
J. Cell Biol. 105/5,1666 (1986)

CELIS,J.E. & NIELSEN,S.:

Proliferation-sensitive nuclear phosphoprotein "dividin" is synthesized almost exclusively during S-phase of the cell-cycle in human AMA-cells  
PNAS 83,8187 (1986)

CHIN,B.; FRIEDRICH,P.; BERNSTEIN,I.A.:

Stimulation of mitosis following fusion of plasmodia in the myxomycete *Physarum polycephalum*  
J. Gen. Microbiol. 71,93 (1972)

COPPOCK,D.L. & PARDEE,A.B.:

J. Cell. Physiol. 124,269 (1985)

CROY,R.B. & PARDEE,A.B.:

Enhanced synthesis and stabilization of M-68000 protein in transformed BALB / c-3T3 cells: candidate for restriction point of growth control  
PNAS 80,4699 (1983)

CRUEGER,W. & CRUEGER,A.:

*Lehrbuch der angewandten Mikrobiologie*  
(1982)

CYERT,M.S. & KIRSCHNER,M.W.:

Regulation of MPF activity in vitro  
Cell 53,185 (1988)

DANIEL, J.W. & RUSCH, H.P.:

*The pure culture of Physarum polycephalum on a partially defined medium*

J. Gen. Microbiol. 25,47 (1961)

DAWSON, K.B.; MADOC-JONES, H.; FIELD, E.O.:

*Variations in the generation times of a strain of rat sarcoma cells in culture*

Exp. C. Res. 38,75 (1965)

DEE, J.:

*Genetics of Physarum polycephalum*

in: *Cell biology of Pysarum and Didymium*, ed. Aldrich, H.C. & Daniels, J.W. S.221 (1982)

DONACCHIE, W.D.:

*Relationship between cell size and time of initiation of DNA replication*

Nature 219,1077 (1968)

DONACCHIE, W.D.:

*The cell cycle of Escherichia coli*

in: *The Cell Cycle*, ed. John, P. (1981)

DOOLITTLE, R.F.; HUNKAPILLER, M.W.; HOOD, L.E.; DEVARE, S.G.;

ROBBINS, K.C.; AARONSON, S.A.; ANTONIADES, H.N.:

*Simian sarcoma virus oncogene v-sis is derived from the gene encoding a platelet derived growth factor*

Science 221,275 (1983)

DOWNWARD, J.; YARDEN, Y.; MAYES, E.; SCRASE, G.; TOTTY, N.;

STOCKWELL, P.; ULLRICH, A.; SCHLESSINGER, J.; WATERFIELD, M.D.:

*Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erb-B oncogene protein sequences*

Nature 307,521 (1983)

DRAETTA, G. & BEACH, D.:

*Activation of cdc2 protein kinase during mitosis in human cells: cell cycle dependent phosphorylation and subunit rearrangement*

Cell 54,17 (1988)

DRAETTA, G.; LUCA, F.; WESTENDORF, J.; BRIZUELA, L.; RUDERMAN, J.;

BEACH, D.:

*Cdc2 protein kinase is complexed with both cyclin A and B: evidence for proteolytic inactivation of MPF*

Cell 56,829 (1989)

DUMONT, J.E.; JAUNIAUX, J.C.; ROGER, P.P.:

*The cyclic AMP mediated stimulation of cell proliferation*

TIBS 14,67 (1989)

DUNPHY, W.G. & NEWPORT, J.W.:

J. Cell. Biol. 106,2047 (1988)

DURKACZ, B.; CARR, A.; NURSE, P.:

*Transsscription of the cdc2 cell cycle control gene of the fission yeast S.pombe*

EMBO J. 5,369 (1986)

EBINA,Y.; ELLIS,L.; HARNAGIN,K.; EDERY,M.; GRAF,L.; CLAUSEN,E.;  
OU,J.; MASIAZZ,F.; KAN,Y.K.; GOLDFINE,I.D.; ROTH,R.A.; RUTTER,W.:  
*The human insulin receptor cDNA: the structural basis for hormone  
activated transmembrane signalling*  
Cell 40,747 (1985)

ENGLERT,W.; ULLRICH,G.; HEMPEL,K.:  
*Fluctuations in S-adenosyl-L-methionine (AdoMet) during the cell  
cycle of the myxomycete Physarum polycephalum*  
Exp. Cell Res. 159,247 (1985)

EON-GERHARDT,R.; TOLLON,Y.; WRIGHT,M.:  
*Regulation of mitosis onset and thymidine kinase synthesis during  
the cell cycle of Physarum polycephalum: action of aphidicolin*  
Eur. J. Cell Biol. 25,82 (1981)

EON-GERHARDT,R.; TOLLON,Y.; CHRAIBI,R.; WRIGHT,M.:  
*Regulation of thymidine kinase synthesis during the cell cycle of  
Physarum polycephalum: the effects of microtubule inhibitors*  
Cytobios 32,47 (1981)

EXENBERGER,R.:  
Dissertation Universität Innsbruck, Österreich (1983)

FANTES,P.:  
*Isolation of cell size mutants of a fission yeast by a new  
selective method: characterization of mutants and implications  
for division control mechanisms*  
J. bacter. 146,746 (1981)

FERRARI,S. & BASERGA,R.:  
*Oncogenes and cell cycle genes*  
Bioessays 7/1,9 (1987)

FIGGE,J. & SMITH,T.F.:  
*Cell division sequence motif*  
Nature 334,109 (1988)

FINK,K.:  
*Fluctuations in deoxyribo- and ribonucleoside-triphosphate pools  
during the mitotic cycle of Physarum polycephalum*  
BBA 414,85 (1975)

FISHBEIN,W.N. & WINKERT,J.W.:  
*Parameters of freezing damage to enzymes*  
in: Peptides 1979, S.55

FITZPATRICK,V.D. & INGLES,J.:  
*The Drosophila fushi tarazu polypeptide is a DNA binding  
transcriptional activator in yeast cells*  
Nature 337,666 (1989)

FORDE,B.G. & SACHSENMAIER,W.:  
*Oxygen uptake and mitochondrial enzyme activities in the mitotic  
cycle of Physarum polycephalum*  
J. Gen. Microbiol. 115,135 (1979)

- FUNDERUD,S.; ANDREASSEN,R.; HAUGLI,F.:  
*Size distribution and maturation of newly replicated DNA through the S and G2 phases of Physarum polycephalum*  
 Cell 15,1519 (1978)
- GAUTIER,J.; NORBURY,C.; LOHKA,M.; NURSE,P.; MALLER,J.:  
*Purified maturation promoting factor contains the product of a Xenopus homolog to the fission yeast cell cycle control gene cdc2+*  
 Cell 54,433 (1988)
- GERRACE,L. & BLOBEL,G.:  
*The nuclear envelope lamina is reversibly depolymerized during mitosis*  
 Cell 19,277 (1980)
- GERSON,D.F. & BURTON,A.C.:  
*The relation of cycling of intracellular pH to mitosis in Physarum polycephalum*  
 J. Cell. Physiol. 91,297 (1976)
- GOLDERER,G.; LOIDL,P.; GRÖBNER,P.:  
*Histone acetyltransferase activity during the cell cycle*  
 FEBS 222/2,322 (1987)
- GOLDERER,G.; SCHNEIDER,R.; AUER,B.; LOIDL,P.; GRÖBNER,P.:  
*ADP-ribosylation during the cell cycle of Physarum polycephalum*  
 Biol. Chem. Hoppe Seyl. 368/9,1046 (1987)
- GOOD,N.E.; WINGET,G.D.; WINTER,W.; CONOLLY,T.N.; IZAWA,S.; SINGH,M.M.:  
*Hydrogen ion buffers for biological research*  
 Biochemistry 5,467 (1966)
- GRÖBNER,P. & LOIDL,P.:  
*Thymidylate synthetase during the synchronous nuclear division cycle and differentiation of Physarum polycephalum*  
 BBA 697,83 (1982)
- GRÖBNER,P. & LOIDL,P.:  
*Thymidine kinase - a novel affinity chromatography of the enzyme and its regulation by phosphorylation in Physarum polycephalum*  
 J. Biol. Chem. 259/12,8012 (1984)
- GRÖBNER,P. & LOIDL,P.:  
*ADP-ribosyltransferase in isolated nuclei during the cell cycle of Physarum polycephalum*  
 Biochem. J. 232,21 (1985)
- GUENTHER,J.; NICK,H.; MONARD,D.:  
*A glia derived neurite-promoting factor with protease inhibitory activity*  
 EMBO J. 4/8,1963 (1985)
- HAGINO,K.; MUROFUSHI,K.; OHTA,J.:  
*Effects of colchicine on the mitosis of Physarum polycephalum*  
 Plant C. Phys. 19/4,711 (1978)

- HALL, L. & TURNOCK, G.:  
*Synthesis of ribosomal RNA during the mitotic cycle in the slime mold Physarum polycephalum*  
 Eurp. J. Biochem. 62, 471 (1976)
- HAN, K.; LEVINE, M.; MANLEY, J. L.:  
*Synergistic activation and repression of transsscription by Drosophila homeobox proteins*  
 Cell 56, 573 (1989)
- HAYLES, J.; AVES, S.; NURSE, P.:  
*suc1 is an essential gene involved in both the cell cycle and growth in fission yeast*  
 EMBO J. 5, 3373 (1986)
- HECK, M. M. S. & EARNSHAW, W. C.:  
*Topoisomerase II : a specific marker for cell proliferation*  
 J. Cell Biol. 103, 2569 (1986)
- HERDUGO, G. G. & TYSON, J. J.:  
*Induction of polyploid nuclei in Physarum polycephalum by cycloheximid treatment in prophase*  
 Exp. Cell Res. 153/2, 110 (1984)
- HINDLEY, J. & PHEAR, G.:  
*Sequence of the cell division gene cdc2 from S. Pombe: patterns of splicing and homology of protein kinases*  
 Gene 31, 129 (1984)
- HOLLAND, B.:  
*Genetic analysis of the E. Coli division clock*  
 Cell 48, 361 (1987)
- HOLLAND, B. & JONES, W.:  
 Ann. Inst. Pasteur 136a, 165 (1985)
- HOLZER, H.:  
*The biological function of proteinases*  
 1979
- HÜTTERMANN, A.; PORTER, M. T.; RUSCH, H.:  
*Activity of some enzymes in Physarum polycephalum*  
 Arch. Microbiol. 74, 90 (1970)
- HUNTER, G. J. & TURNOCK, G.:  
*In vivo transsscription of ribosomal RNA in relation to the mitotic cycle in Physarum polycephalum*  
 J. Cell Sc. 76, 135 (1985)
- INGLIS, R. J.:  
*Advance of mitosis by histone phosphokinase*  
 Exp. Cell Res. 97, 418 (1976)
- JAMES, R. & BRADSHAW, R. A.:  
*Polypeptide growth factors*  
 Ann. Rev. Biochem. 53, 259 (1984)

- JERZMANOWSKI, A. & MALESZEWSKI, M.:  
*Phosphorylation and methylation of Physarum histone H1 during the mitotic cycle*  
 Biochem. USA 24/9, 2360 (1985)
- JOHNSTON, G.; PRINGLE, S. & HARTWELL, L.:  
*Coordination of growth with cell division in the yeast Saccharomyces cerevisiae*  
 Exp. C. Res. 105, 79 (1977)
- KAI, R.; OHTSUBO, M.; SEKIGUCHI, M.; NISHIMOTO, T.:  
*Molecular cloning of a human gene that regulates chromosome condensation and is essential for cell proliferation*  
 Mol. C. Biol. 6, 2027 (1986)
- KAMIYA, N.; YOSHIMOTO, Y.; MATSUMARA, F.:  
*Contraction-relaxation cycle of Physarum cytoplasm: concomitant changes in intraplasmoidal ATP and Ca<sup>++</sup> concentrations*  
 Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol. 46, 77 (1982)
- KARSENTI, E.; BRAVO, R.; KIRSCHNER, M.:  
*Phosphorylation changes associated with the early cell cycle in Xenopus eggs*  
 Dev. Biol. 119, 442 (1987)
- KAUFFMAN, S. & SHYMKO, R.:  
*Mitotic delay following inhibition by 5-FdUrd of S-phase in Physarum polycephalum is not due to delay in termination of S-phase*  
 J. Cell Sc. 53, 143 (1982)
- KESSLER, D.:  
*Change of contractile behaviour in plasmodia of Physarum polycephalum during mitosis*  
 Protop. 124/1-2, 71 (1985)
- KISHIMOTO, T. & KONDO, H.:  
*Extraction and preliminary characterization of maturation promoting factor from starfish oocytes*  
 Exp. Cell Res. 163, 445 (1986)
- KLIBANOV, A.M. & AHERN, T.J.:  
*Thermal stability of proteins*  
 in: Protein engineering, ed. A. Liss 213, 1987
- KOCH, A. & SCHAECHTER, M.:  
*A model for statistics of the cell division process*  
 J. Gen. microbiol. 29, 435 (1962)
- KUBBIES, M.; WICK, R.; HILDEBRANDT, A.; SAUER, H.W.:  
*Flow cytometry reveals a high degree of genomic size variation and mixoploidy in various strains of the unicellular slime mold Physarum polycephalum*  
 Cytometry 7, 481 (1986)
- KUKULIES, J.; STOCKEM, W.; ACHENBACH, F.:  
*Distribution and dynamics of fluorochromed actin in living stages of Physarum polycephalum*  
 Eur. J. Cell Biol. 35/2, 235 (1984)

LABBE, J.C.; LEE, M.C.; NURSE, P.; PICARD, A.; DOREE, M.;;  
*Activation at M phase of a protein kinase encoded by a starfish  
homologue of the cell cycle control gene cdc2+*  
Nature 335,251 (1988)

LAEMMLI, U.K.:  
*Cleavage of structural proteins during the assembly of the head  
of bacteriophage T4*  
Nature 227,680 (1970)

LAFFLER, T.:  
*The tubulin and histone genes of Physarum polycephalum: models  
for cell cycle regulated expression*  
Bioassay 5/2,62 (1986)

LAFFLER, T.G. & TYSON, J.:  
*The Physarum cell cycle*  
in: Molecular biology of Physarum, ed.Dove, F. 79 (1986)

LAFFLER, T. & CARRINO, J.:  
*Cell cycle regulated translation of histone mRNA in Physarum  
polycephalum plasmodia*  
J. Bacter. 169/5,2291 (1987)

LEE, M.G. & NURSE, P.:  
*Complementation used to clone a human homologue of the fission  
yeast cell cycle control gene cdc2*  
Nature 327,31 (1987)

LEE, M.G.; NORBURY, C.J.; SPURR, N.K.; NURSE, P.:  
*Regulated expression and phosphorylation of a possible mammalian  
cell-cycle control protein*  
Nature 333,676 (1988)

LISKAY, R.M.:  
*Absence of a measurable G2 phase in two chinese hamster cell  
lines*  
PNAS 74,1622 (1977)

LOHKA, M.J.; HAYES, M.K.; MALLER, J.L.:  
*Purification of maturation promoting factor, an intracellular  
regulator of early mitotic events*  
PNAS 85,3009 (1988)

LOIDL, P. & GRÖBNER, P.:  
*Acceleration of mitosis induced by mitotic stimulators of  
Physarum polycephalum*  
Exp. Cell Res. 137C,469 (1982)

LOIDL, P. & SACHSENMAIER, W.:  
*Control of mitotic synchrony in Physarum polycephalum. Phase  
shifting by fusion of heterophasic plasmodia contradicts a limit  
cycle oscillator*  
Eur. J. of Cell Biol. 28,175 (1982)

LOIDL, P.; LOIDL, A.; PUSCHENDORF, B.; GRÖBNER, P.:  
*Lack of correlation between histone H4 acetylation and  
transcription during the Physarum cell cycle*  
Nature 305,446 (1983)

LOIDL,P. & GRÖBNER,P.:

*An immunological approach to enrich a mitotic stimulator and to reveal G2-phase-specific proteins in Physarum polycephalum*  
J. Cell Biol. 100,1930 (1985)

LOIDL,P.; GRÖBNER,P.; CSORDAS,A.; PUSCHENDORF,B.:

*Effect of sodium-n-butyrate on Physarum polycephalum*  
in: Biology of Physarum, ed. Rakoczy,L. (1981) S.90

LORINCZ,A.T. & REED,S.R.:

*Primary structure homology between the product of yeast cell division control gene cdc28 and vertebrate oncogenes*  
Nature 307,183 (1984)

LOVELY,J.R. & THRELFALL,R.J.:

*Fluctuations in cAMP and cGMP during the mitotic cycle of the acellular slime mold Physarum polycephalum*  
Biochem. Biophys. Res. Comm. 71/3,789 (1976)

LUTGENHAUS,J.F.; MOORE,B.A.; MASTERS,M.; DONACCHIE,W.D.:

*Individual proteins are synthesized continuously throughout the cell cycle of E.Coli.*  
J. bacter. 138,352 (1979)

MAC NICOL,A.M., BANKS,G.R.; COX,R.A.:

*Biosynthesis and activity of DNA polymerase throughout the mitotic cycle of Physarum polycephalum*  
FEBS 221/1,48 (1987)

MAGUN,B.:

*Changes in cytoplasmic DNA-binding phosphoproteins during the cell cycle of Physarum polycephalum*  
Cell diff. 8,157 (1979)

MARIANI,B.D. & SCHIMKE,R.T.:

*Gene amplification in a single cell cycle in chinese hamster ovary cells*  
J. Biol. Chem. 259,1901 (1985)

MARSHALL,C.J.:

*Oncogenes and growth control*  
Cell 49,723 (1987)

MARX,J.L.:

*Cell growth control comes under scrutiny*  
TIBS 3,1093 (1988)

MASUI,Y. & MARKERT,C.L.:

*Cytoplasmic control of nuclear behaviour during meiotic maturation of frog oocytes*  
J. exp. zool. 177,129 (1971)

MATSUMOTO,S.:

*Onset time of signal for mitosis estimated from mitotic delays in UV-irradiated plasmodia of Physarum polycephalum*  
Cell Struct. and Funct. 2,101 (1977)

- MORISAWA, M. & STEINHARDT, R.A.:  
*Changes in intracellular pH of Physarum plasmodia during the cell cycle and in response to starvation*  
 Exp. Cell Res. 140,341 (1982)
- MURRAY, A.:  
*Cyclins in meiosis and mitosis*  
 Nature 326,542 (1987)
- MURRAY, A.:  
*A cycle is a cycle is a cycle*  
 Nature 327,14 (1987)
- NANNINGA et al:  
 Ann. Inst. Pasteur 136a,139 (1985)
- NASMYTH, K.; NURSE, P.; FRASER, R.:  
*The effect of cell mass on the cell cycle timing and duration of S-phase in fission yeast*  
 J. Cell Sc. 39,215 (1979)
- NATIONS, C.; ALLEN, R.G.; FARMER, K.J.; TOY, P.L.; SOHAL, R.S.:  
*Superoxide dismutase activity during the plasmodial life cycle of Physarum polycephalum*  
 Experientia 42/1,64 (1986)
- NEWPORT, J.W. & KIRSCHNER, M.W.:  
*Regulation of the cell cycle during early Xenopus development*  
 Cell 37,731 (1984)
- NURSE, P.:  
*Cell cycle control - both deterministic and probabilistic ?*  
 Nature 286,9 (1980)
- NURSE, P. & THURIAUX, P.:  
*Regulatory genes controlling mitosis in the fission yeast Schizosaccharomyces pombe*  
 Genetics 96,627 (1980)
- NYGAARD, O.F.; GUTTES, S.; RUSCH, H.P.:  
*Nucleic acid metabolism in a slime mold with synchronous mitosis*  
 BBA 38,298 (1960)
- OPPENHEIM, A. & KATZIR, Z.:  
*Advancing the onset of mitosis by cell free preparation of Physarum polycephalum*  
 Exp. Cell Res. 68,224 (1971)
- PAHLIC, M. & TYSON, J.:  
*Analysis of Physarum proteins throughout the cell cycle by two-dimensional PAGE*  
 Exp. Cell Res. 161,533 (1985)
- PARDEE, A.; DUBROW, R.; HAMLIN, J.L.; KLETZIEN, R.F.:  
*Animal cell cycle*  
 Ann. Rev. Biochem. 47,715 (1978)

PICARD,A.; PEAUCELLIER,G.; LE BOUFFANT,F.; LE PEUCH,C.; DOREE,M.:  
*Role of protein synthesis and proteases in production and inactivation of maturation promoting activity during meiotic maturation of starfish oocytes*  
Dev. Biol. 109,311 (1985)

POEHLING,H.M. & NEUHOFF,V.:  
*One and two dimensional microelectrophoresis and "staining" of proteins with a silver method*  
in: Electrophoresis 1981, ed. Arnaud,A. (1981)

PORTER,R. & O'CONNOR,M.:  
*Substance P in the nervous system*  
Ciba foundation symposium 91 (1982)

POUYSSÉGUR,J.; SARDET,C.; FRANCHI,A.; L'ALLEMAIN,G.; PARIS,S.:  
*A specific mutation abolishing Na/H antiport activity in hamster fibroblasts precludes growth at neutral and acidic pH*  
PNAS 81,4833 (1984)

PRELICH,G.; KOSTURA,M.; MARSHAK,D.R.; MATHEWS,M.B.; STILLMAN,B.:  
*The cell cycle regulated proliferating cell nuclear antigen is required for SV40 DNA replication in vitro*  
Nature 326,471 (1987)

RAPAPORT,E. & ZAMECNIK,P.C.:  
*Presence of diadenosine-5',5"-pl,p4-tetraphosphate (AP4A) in mammalian cells in levels varying widely with proliferative activity of the tissue: a possible "pleiotypic activator"*  
PNAS 73,3984 (1976)

ROBERTSON,M.:  
*Control of cell growth: molecular associations and conceptual connection*  
Nature 334,100 (1988)

ROBINSON,L.C.; GIBBS,J.B.; MARSHALL,M.S.; SIGAL,I.; TATCHELL,K.:  
*CDC25, a component of the RAS-adenylate cyclase pathway in S.cerevisiae*  
Science 235,1218 (1987)

ROBINSON,A.C. & DONACCHIE,W.D.:  
*Prokaryotic and eucaryotic cell-cycle proteins*  
Nature 328,766 (1987)

ROSS,R.; RAINES,E.W.; BOWEN-POPE,D.F.:  
*The biology of platelet derived growth factor*  
Cell 46,155 (1986)

ROZENGURT,E.:  
*Early signals in the mitogenic response*  
Science 234,161 (1986)

RUSCH,H.P.; SACHSENMAIER,W.; BEHRENS,K.; GRUTER,V.:  
*Synchronization of mitosis by the fusion of the plasmodia of Physarum polycephalum*  
J. Cell Biol. 31,204 (1966)

RUSSEL,P.R. & NURSE,P.:  
*cdc25+ functions as an inducer in the mitotic control of fission*

yeast  
CELL 45,145 (1986)

RUSSEL,P. & NURSE,P.:  
*The mitotic inducer nim1+ functions in a regulatory network of protein kinase homologs controlling the initiation of mitosis*  
Cell 49,569 (1987)

SACHSENMAIER,W.; REMY,U.; PLATTNER-SCHOBEL,R.:  
*Initiation of synchronous mitosis in Physarum polycephalum*  
Exp. C. Res. 73,41 (1972)

SACHSENMAIER,W.:  
*Does the transition probability model apply to the nuclear cycle in Physarum polycephalum ?*  
in: Biology of Physarum, ed. Rakoczy,L. (1981) S.109

SACHSENMAIER,W.:  
*The mitotic cycle in Physarum polycephalum*  
in: The cell cycle, ed. JOHN,P. (1981)

SAUER,H.:  
*Introduction to Physarum*  
in: Molecular biology of Physarum, ed.Dove,J. (1986)

SAUER,H.; SHIPLEY,G.L.; CHRISTENSEN,M.E.; NADER,W.; DILLER,J.;  
CHOI,J.:  
*Evidence for the expression of a myc-protocogene homolog in the naturally synchronous mitotic cycle of Physarum*  
J. C. Biochem 10C,158 (1986)

SAWADA,F.:  
*Cell cycle dependent variations in RNA-polymerase activity in the nuclear and cytoplasmic fractions of Physarum polycephalum*  
Cell Struc. Func. 10/1,55 (1985)

SCHÄGGER,H. & VON JAGOW,G.:  
*Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100kDa*  
Anal. Biochem. 166,368 (1987)

SCHEFFEY,C.:  
*Cycloheximid induced mitotic delay in Physarum polycephalum*  
Exp. C. Res. 113,259 (1978)

SCHLEGEL,R. & PARDEE,A.B.:  
*Caffeine induced uncoupling of mitosis from the completion of DNA replication in mammalian cells*  
Science 232/4755,1264 (1986)

SCHLEICHER,M. & WATTERSON,D.M.:  
*Analysis of differences between coomassie blue stain and silver stain procedures in polyacrylamide gels: conditions for the detection of Calmodulin and Troponin C*  
Anal. Biochem. 131,312 (1983)

SCHOLLMEYER,J.E.:  
*Calpain II involvement in mitosis*  
Science 240,911 (1988)

- SCHULLMAN, H. & LOU, L.L.:  
*Multifunctional Ca<sup>2+</sup> / calmodulin dependent protein kinase: domain structure and regulation*  
 TIBS 14,62 (1989)
- SCOPES, R.:  
*Protein purification*  
 Springer N.Y. 1982
- SHERR, C.J.; RETTENMIER, C.W.; SACCA, R.; ROUSSEL, M.F.; LOOK, A.T.; STANLEY, E.R.:  
*The c-fms protooncogene product is related to the receptor for the mononuclear phagocyte growth factor CSF-1*  
 Cell 42,665 (1985)
- SHIBAYAMA, T.; NAKAYA, K.; MATSUMOTO, S.; NAKAMURA, Y.:  
*Cell cycle dependent change in the phosphorylation of nucleolar proteins of Physarum polycephalum in vivo*  
 FEBS 139,214 (1982)
- SHIBAYAMA, T.; NAKAYA, K.; NAKAMURA, Y.:  
*Change in phosphorylation of nucleolar proteins of Physarum polycephalum during the cell cycle in vivo and in vitro*  
 J. Biochem. 94/5,1579 (1983)
- SHORT, N.J.:  
*Regulation of transscription: an oncogene caught red-handed ?*  
 Nature 330,209 (1987)
- SIMANIS, V. & NURSE, P.:  
*The cell cycle control gene cdc2+ of fission yeast encodes a protein kinase potentially regulated by phosphorylation*  
 CELL 45,261 (1986)
- SIMANIS, V.; RUSSEL, P.; NURSE, P.:  
*Cell cycle control genes of the fission yeast S.pombe in: Cell cycle and oncogenes*  
 Ed.: TANNER, W. (1986)
- SMITH, J.A. & MARTIN, L.:  
*Do cells cycle ?*  
 PNAS 70,1263 (1973)
- SOLAO, P.B. & SHALL, S.:  
*Control of DNA-replication in Physarum polycephalum: specific activity of NAD-pyrophosphorylase in isolated nuclei during the cell cycle*  
 Exp. Cell Res. 69,295 (1971)
- SOLOMON, M.; BOOHER, R.; KIRSCHNER, M.; BEACH, D.:  
*Cyclin in fission yeast*  
 Cell 54,738 (1988)
- SPORN, M.B. & ROBERTS, A.B.:  
*Peptide growth factors are multifunctional*  
 Nature 332,217 (1988)

STRUHL,K.:

*The DNA binding domains of the jun oncoprotein and the yeast GCN4 transscrptional activator protein are functionally homologous*  
Cell 50,841 (1987)

SUDBERY,P.E. & GRANT,W.D.:

*The control of mitosis in Physarum polycephalum. The effect of lowering the DNA:mass ratio by UV-irradiation*  
Exp. Cell Res. 95,405 (1975)

SWENSON,K.I.; FARRELL,K.M.; RUDERMAN,J.V.:

*The Clam embryo protein Cyclin A induces entry into M phase and the resumption of meiosis in Xenopus oocytes*  
Cell 47,861 (1986)

TABORSKY,G.:

*Protein alterations at low temperatures: an overview*  
in: Peptides 1979

TONG,M.M. & PINCOCK,R.E.:

*Denaturation and reactivity of invertase in frozen solutions*  
Biochem. 8,908 (1969)

TURNOCK,G.; CHAMBERS,J.; BIRCH,B.:

*Regulation of protein synthesis in the plasmodial phase of Physarum polycephalum*  
Eur. J. Biochem. 120,529 (1981)

TYSON,J.; GARCIA-HERDUGO,G.; SACHSENMAIER,W.:

*Control of nuclear division in Physarum polycephalum. Comparison of cycloheximid pulse treatment, UV-irradiation, and heat shock*  
Exp. Cell Res. 119,87 (1979)

TYSON,J. & SACHSENMAIER,W.:

*Is nuclear division in Physarum controlled by a continuous limit cycle?*  
J. Theor. Biol. 73,723 (1978)

TYSON,J. & SACHSENMAIER,W.:

*The control of nuclear division in Physarum polycephalum*  
in: The Cell Cycle, ed.Edmunds,L. S.253 (1985)

TYSON,J.:

*Size control of cell division*  
J. Theor. Biol. 126,381 (1987)

UEDA,T.; VON OLENHUSEN,K.G.; WOHLFARTH-BOTTERMANN,K.E.:

*Reaction of the contractile apparatus in Physarum to injected Ca,ATP,ADP and AMP*  
Cytobiologie 18,76 (1978)

VAN WIJK,R.; VAN DEN POLL,K.; AMESZ,W.; GEILENKIRCHEN,W.:

*Studies on the variations in generation times of rat hepatoma cells in culture*  
Exp. C. Res. 109,371 (1977)

WANG,E. & LIN,S.L.:

*Disappearance of Statin, a protein marker for non-proliferating and senescent cells, following serum-stimulated cell cycle entry*  
Exp. C. Res. 167,135 (1986)

- WARD, J.A. & LUTGENHAUS, J.:  
*Overproduction of FtsZ induces minicell formation in E.coli*  
 Cell 42,941 (1985)
- WEGENER, G. & SAUER, H.W.:  
*No growth cycle in Physarum ?*  
 Exp. Cell Res. 135,399 (1981)
- WEINMANN-DORSCH, C.; PIERRON, G.; WICK, R.; SAUER, H.; GRUMMT, F.:  
*High Diadenosin-tetraphosphate (AP4A) level at initiation of S-phase in the naturally synchronous mitotic cycle of Physarum polycephalum*  
 Exp. Cell Res. 155,171 (1984)
- WHEELS, A. & SILVERMAN, B.:  
*Unstable activator model for size control of the cell cycle*  
 J. Theor. Biol. 97,505 (1982)
- WHITFIELD, W.G.F.; GONZALEZ, C.; SANCHEZ-HERRERO, E.; GLOVER, D.M.:  
*Transcripts of one of two Drosophila cyclin genes become localized in pole cells during embryogenesis*  
 Nature 338,337 (1989)
- WILLE, J. & STEFFENS, W.L.:  
*The effects of anaerobiosis and uncouplers of oxidative phosphorylation on mitotic timing in Physarum polycephalum*  
 Protoplasma 105,251 (1981)
- WOLF, R.; WICK, R.; SAUER, H.:  
*Mitosis in Physarum polycephalum: analysis of time laps films and DNA replication of normal and heatshocked plasmodia*  
 Eur. J. Cell Biol. 19,49 (1979)
- WRAY, W.; BOUKLIAS, T.; WRAY, V.; HANCOCK, R.:  
*Silver staining of proteins in polyacrylamide gels*  
 Anal. Biochem. 118,197 (1981)
- YANAGISAWA, M.; KURIHARA, H.; KIMURA, S.; TOMOBE, Y.; KOBAYASHI, M.; MITSUI, Y.; YAZAKI, Y.; GOTO, K.; MASAKI, T.:  
*A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells*  
 Nature 332,411 (1988)
- ZELLWEGER, A.; RYSER, U.; BRAUN, R.:  
*Ribosomal genes of Physarum: their isolation and replication in the mitotic cycle*  
 J. Mol. Biol. 64,681 (1972)
- ZETTERBERG, A. & LARSSON, O.:  
*Kinetic analysis of regulatory events in G1 leading to proliferation or quiescence of Swiss 3T3 cells*  
 PNAS 82,5365 (1985)

## DANKSAGUNG

Mein herzlicher Dank gilt in erster Linie Herrn Prof. Dr.L.Rensing, der mir bei der Wahl, Planung und Durchführung dieser Arbeit freie Hand liess und stets bereit war, mich in meinen Bemühungen zu unterstützen. Ich danke Herrn Prof. Dr.A.Hildebrandt für die Überlassung von Organismen und Geräten. Dr.R.Frank an der GBF Braunschweig und seinem netten Arbeitskreis danke ich für die apparative und kommentierende Hilfe. Schliesslich danke ich meinen Eltern, die mir den 'Biss' mitgaben, ohne den diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.











